

2/3,AB/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007513569

WPI Acc No: 1988-147502/198821

XRAM Acc No: C88-065712

XRPX Acc No: N88-112640

New viral agent associated with non-A, non-B hepatitis - and derived antigens and antibodies, useful for diagnosis and treatment

Patent Assignee: INST PASTEUR (INSP )

Inventor: PILLOT J

Number of Countries: 018 Number of Patents: 013

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 8803410	A	19880519	WO 87FR441	A	19871106	198821 B
FR 2606515	A	19880513	FR 8615625	A	19861107	198826
EP 277437	A	19880810	EP 87402519	A	19871106	198832
AU 8782734	A	19880601				198841
DK 8803753	A	19880907				198848
JP 1501205	W	19890427	JP 87506994	A	19870106	198923
ZA 8708303	A	19890530	ZA 878303	A	19871105	198927
NZ 222465	A	19921125	NZ 222465	A	19871105	199305
NZ 235402	A	19921125	NZ 235402	A	19871105	199305
EP 277437	B1	19930303	EP 87402519	A	19871106	199309
DE 3784484	G	19930408	DE 3784484	A	19871106	199315
			EP 87402519	A	19871106	
ES 2054696	T3	19940816	EP 87402519	A	19871106	199434
JP 2602517	B2	19970423	JP 87506994	A	19871106	199721
			WO 87FR441	A	19871106	

Priority Applications (No Type Date): FR 871738 A 19870211; FR 8615625 A 19861107

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

WO 8803410	A	F	52		
------------	---	---	----	--	--

Designated States (National): AU DK JP

EP 277437	A	F			
-----------	---	---	--	--	--

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

NZ 235402	A		G01N-033/53	Div ex patent	NZ 222465
-----------	---	--	-------------	---------------	-----------

EP 277437	B1	F	23	A61K-039/29	
-----------	----	---	----	-------------	--

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

DE 3784484	G		A61K-039/29	Based on patent	EP 277437
------------	---	--	-------------	-----------------	-----------

ES 2054696	T3		A61K-039/29	Based on patent	EP 277437
------------	----	--	-------------	-----------------	-----------

JP 2602517	B2	12	C12N-007/00	Previous Publ. patent	JP 1501205
------------	----	----	-------------	-----------------------	------------

Based on patent WO 8803410

NZ 222465	A		A61K-039/29		
-----------	---	--	-------------	--	--

Abstract (Basic): WO 8803410 A

New purified viral agent (I) implicated in non-A, non-B viral hepatitis (NANBVH) is characterised by a distribution of antigenic activity which includes at least one band of density 1.28-1.32 g/cc and/or at least one band of density 1.12-1.19 g/cc. Also new are (1) antigens (Ag) associated with (I); (2) the purified viral agent strains deposited as CNCM I-616 and 617; (3) immunological reagents consisting of Ig recovered from sera of convalescent humans (or artificially infected animals) and (4) the therapeutic agents consisting of

antibodies (Ab) directed against (I).

USE - Antibodies are used to detect NANBVH Ag in faeces, while (I) can be used to detect antibodies in blood (including that intended for transfusion). Detecting IgM antibody activity provides a very early diagnosis of infection. Ag can also be used as vaccine components.

Abstract (Equivalent): EP 277437 B

Purified viral agent associated with sporadic, epidermic and post-transfusional viral hepatitis NANB, characterised in that it can be obtained from the faeces of patients suffering from hepatitis NANB and in that it is in the form of two main types of spherical viral particles associated with the same viral antigen; (a) spherical particles of about 75 nm in diameter whose density in a CsCl gradient is between 1.28 and 1.32 g/cm<sup>3</sup> and which sediment in sucrose gradient fractions containing between 40 and 41.5% (w/v) of sucrose, (b) spherical particles from 25 to 30 nm in diameter whose density in a CsCl gradient is between 1.12 and 1.19 g/cm<sup>3</sup> and which sediment in sucrose gradient fractions containing between 26 and 28% (w/v) of sucrose.

(Dwg.0/5)

⑨



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

⑪ Numéro de publication:

**0 277 437**  
**A1**

⑫

# **DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

⑲ Numéro de dépôt: **87402519.0**

⑤① Int. Cl. 4: **A61K 39/29 , G01N 33/576**

⑳ Date de dépôt: **06.11.87**

Les microorganismes ont été déposés auprès la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) sous les numéros I - 616 et I - 617 et auprès European Collection of Animal Cell Cultures sous le numéro V87020502.

Le titre de l'invention a été modifié (Directives relatives à l'examen pratiqué à l'OEB, A-III, 7.3)

⑳ Priorité: **07.11.86 FR 8615625**  
**11.02.87 FR 8701738**

④③ Date de publication de la demande:  
**10.08.88 Bulletin 88/32**

⑤④ Etats contractants désignés:  
**AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

⑦① Demandeur: **INSTITUT PASTEUR**  
**25-28, rue du Docteur Roux**  
**F-75724 Paris Cédex 15(FR)**

⑦② Inventeur: **Pillot, Jacques**  
**14, Chemin de Moulon**  
**F-91190 Gif-Sur-Yvette(FR)**

⑦④ Mandataire: **Orès, Bernard et al**  
**Cabinet ORES 6, Avenue de Messine**  
**F-75008 Paris(FR)**

⑤④ **Agent viral de l'hépatite NANB, antigène et réactif immunologique.**

⑤⑦ **Nouvel agent viral purifié impliqué dans l'hépatite virale non-A non-B, épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, défini le profil de répartition de son activité antigénique, qui comporte au moins une bande à une densité de 1,28-1,32 g/cm<sup>3</sup> et/ou au moins une bande à une densité de 1,17-1,19 g/cm<sup>3</sup>, et l'antigène associé à cet agent viral.**

**Procédé d'isolement dudit agent viral et de l'antigène qui lui est associé. Utilisation dudit agent viral en tant que réactif de diagnostic.**

**Procédé de détection d'antigène non-A non-B présent dans les fèces de patients atteints d'hépatite virale non-A non-B.**

**Réactif immunologique pour la détection de l'hépatite virale NANB, épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle et procédé d'isolement d'anticorps anti-NANB aptes à être utilisés en tant que réactifs immunologiques.**

**Applications desdits anticorps anti-NANB au diagnostic de l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle et en tant qu'agents thérapeutiques.**

**EP 0 277 437 A1**

**PROCEDE POUR L'ISOLEMENT D'UN NOUVEL AGENT VIRAL IMPLIQUE DANS L'HEPATITE NANB ET DE L'ANTIGENE QUI LUI EST ASSOCIE, AGENT VIRAL ET ANTIGENE OBTENUS PAR CE PROCEDE, PROCEDE DE DETECTION DUDIT ANTIGENE, REACTIFS IMMUNOLOGIQUES POUR LA DETECTION DE L'HEPATITE VIRALE NANB, LEURS PROCEDES DE PREPARATION ET LEURS APPLICATIONS.**

La présente invention est relative à l'isolement et à la caractérisation d'un agent viral impliqué dans l'hépatite non-A non-B tant épidémique que sporadique ou que post-transfusionnelle.

L'hépatite virale peut être causée par le virus de l'hépatite A (HAV), par le virus de l'hépatite B (HBV) et par un nombre inconnu de virus d'hépatite non-A non-B (NANB) non encore identifiés. Actuellement dans les pays développés dans lesquels la prophylaxie de l'HBV est efficace, les NANB sont la cause la plus importante d'hépatite infectieuse conduisant à l'hospitalisation. Cette maladie est considérée comme impliquant au moins trois virus : deux sont transmis par le sang contaminé et les produits de sang contaminé; pour le troisième qui est à l'origine de l'hépatite NANB épidémique, l'inventeur a pu établir qu'il est également responsable de 50 à 60% des cas d'hépatites nécessitant une hospitalisation, rapportés dans les pays occidentaux et son mode de transmission est inconnu. Dans les pays en voie de développement, le NANB semble également associé à des épidémies à grande échelle liées à un mode de transmission fécal-oral véhiculé par l'eau. Actuellement cinq cas d'épidémies de ce type ont été rapportés depuis 1980 : en Inde, en Sibérie, au Népal, en Algérie et récemment en Côte d'Ivoire. Dans tous ces cas, un taux de mortalité élevé a été observé parmi les femmes enceintes.

Nos connaissances actuelles concernant les virus qui sont à l'origine de l'hépatite NANB sont d'une imprécision décourageante et sont limitées à des données cliniques et épidémiologiques. Des agents filtrables ont nettement été isolés par inoculation de sang ou de produits sanguins provenant de sujets souffrant d'hépatite NANB post-transfusionnelle à des chimpanzés et des produits sanguins infectieux sont disponibles. En ce qui concerne l'hépatite NANB épidémique, très peu d'infections expérimentales ont été réalisées : l'infection s'est avérée transmissible aux ouistitis (*Saguinus mystax*), aux singes macaques (*Macacus cynomolgus*) et à un volontaire humain et récemment à des singes verts africains (*Cercopithecus aethiops* et *Erythrocebus patas*), mais aucune préparation infectieuse définie n'a été proposée.

En ce qui concerne l'hépatite post-transfusionnelle, en dépit de la pléthore de rapports sur des systèmes antigène-anticorps NANB, des modifications ultrastructurales et des particules analogues à des virus, tous potentiellement prometteurs, aucun agent causal ni aucun système ou virus qui remplisse les critères sérologiques acceptés pour une association causale spécifique, n'a été identifié antérieurement aux travaux qui ont abouti à la présente invention. En ce qui concerne l'hépatite épidémique, des particules analogues à des virus, de forme sphérique et de 27 nm de diamètre ont été visualisées dans de très rares fèces et la caractérisation immunologique a été médiocrement réalisée par agglutination au microscope électronique. La répllication virale n'a jamais été obtenue dans des cultures cellulaires pour quelque virus NANB que ce soit.

La Demande de Brevet français n° 86 05437, au nom de l'INSTITUT PASTEUR, et qui mentionne Monsieur PILLOT comme Inventeur, a pour objet un réactif propre à permettre la détection d'hépatites virales NANB épidémiques et un procédé de diagnostic mettant en oeuvre ce réactif; le réactif conforme à cette Demande de Brevet est constitué par des IgM anti-NANB isolées de sérums de singes infectés artificiellement par des extraits de fèces de patients connus pour être atteints d'hépatite NANB épidémique, lesquelles IgM anti-NANB sont avantageusement fixées sur des supports solides tels que, notamment, des plaques de PVC.

La poursuite de ses recherches à partir de l'invention objet de la Demande de Brevet précitée a permis à l'inventeur d'atteindre les buts suivants :

1°) Il a infecté des singes dont il a utilisé les anticorps (Ac), ainsi que les Ac de convalescents humains, pour développer un test ELISA pour la détection spécifique d'antigènes (Ag) associés au virus et la détection des Ac anti-viraux;

2°) L'inventeur a réussi à répliquer le virus dans une lignée continue de cellules hépatocytaires avec une bonne production de matériel antigénique;

3°) Il est parvenu à visualiser des particules virales dans des préparations purifiées d'échantillons de fèces et dans des lignées d'hépatocytes infectées;

4°) Il a pu établir l'implication du même agent causal dans l'hépatite virale NANB aussi bien épidémique que sporadique.

5°) En considérant le rôle de l'agent NANB épidémique dans l'hépatite sporadique, l'inventeur a été en mesure de vérifier que ledit agent peut être non seulement véhiculé par l'eau, mais être également transmis par d'autres voies que l'eau et notamment par la voie sanguine transfusionnelle.

La présente invention s'est donné pour but l'identification et la caractérisation d'un nouvel agent viral, ainsi que d'un antigène (Ag) NANB associé à ce nouvel agent viral et une méthode de diagnostic d'hépatite NANB aussi bien épidémique que sporadique et que post-transfusionnelle, par détection de l'Ag associé au virus de NANB, en utilisant les anticorps (Ac) qui font l'objet de la Demande de Brevet INSTITUT  
 5 PASTEUR précitée ou par recherche des Ac du malade, en utilisant le virus ou ses fractions adsorbé sur un support adéquat.

La présente invention a également pour but de pourvoir à des réactifs de diagnostic immunologiques utilisables dans la méthode de diagnostic de l'hépatite NANB conforme à la présente invention, ainsi qu'à un kit prêt à l'emploi pour la réalisation de ladite méthode de diagnostic.

10 La présente invention a pour objet un nouvel agent viral purifié impliqué dans l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, caractérisé en ce qu'il présente un profil de répartition de son activité antigénique qui comporte au moins une bande à une densité de 1,28-1,32 g/cm<sup>3</sup> et/ou au moins une bande à une densité de 1,12-1,19 g/cm<sup>3</sup>.

Selon un mode de réalisation de l'agent viral purifié impliqué dans l'hépatite NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, celui-ci est isolé de fèces de patients atteints d'hépatite NANB, par  
 15 centrifugation et filtration à travers un filtre dont la porosité est de l'ordre de 0,22 µm.

Selon un autre mode de réalisation de l'agent viral impliqué dans l'hépatite NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, celui-ci est obtenu à partir d'hépatocytes ou de lignées cellulaires continues d'hépatocytes, inoculés par de l'extrait de fèces d'un malade atteint d'hépatite NANB ou par un  
 20 extrait de foie d'un singe infecté.

Selon encore un autre mode de réalisation de l'agent viral impliqué dans l'hépatite NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, ledit agent viral auquel est associé l'antigène spécifique, se présente sous la forme de particules virales sphériques de deux type principaux, à savoir des particules d'environ 75 nm de diamètre et des particules de l'ordre de 25 à 30 nm de diamètre, les premières étant majoritaire-  
 25 ment présentes dans les fractions d'un gradient de CsCl de densité variant entre 1,1 et 1,6 g/ml, dont la densité est comprise entre 1,28 et 1,32 g/cm<sup>3</sup> et les fractions à 40-41,5% d'un gradient de saccharose de concentrations variant de 10 à 60% poids/volume et les secondes étant majoritairement présentes dans les fractions du gradient de CsCl de densité comprise entre 1,12 et 1,19 g/cm<sup>3</sup> et les fractions à 26-28% dudit gradient de saccharose.

30 La présente invention a également pour objet un antigène associé au virus NANB défini plus haut, caractérisé en ce qu'il est obtenu par traitement d'un agent viral isolé de fèces de patients, cultivé sur des hépatocytes infectés par le virus de l'hépatite NANB, par des agents de dissociation physiques ou chimiques.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'antigène associé au virus NANB, susdit, ledit antigène est  
 35 obtenu par traitement aux ultra-sons d'un agent viral isolé de lignées cellulaires continues d'hépatocytes infectés par le virus de l'hépatite NANB.

Selon un autre mode de réalisation de l'antigène associé au virus NANB, son profil de répartition dans un gradient de CsCl se présente sous la forme d'une bande à une densité de 1,12-1,19 g/cm<sup>3</sup> et/ou d'une bande de densité 1,28-1,32 et l'antigène est présent après ultra-centrifugation des fractions de CsCl dans  
 40 un gradient de saccharose, dans la fraction à 26-28% du gradient de saccharose pour la première bande et dans la fraction à 40-41,5% du gradient de saccharose pour la seconde bande.

La présente invention a, de plus, pour objet un procédé d'isolement d'un agent viral impliqué dans l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, qui est caractérisé en ce que des fèces de patients atteints d'hépatite NANB sont soumises à un traitement de centrifugation, suivi d'un  
 45 traitement de filtration à travers un élément filtrant dont la porosité est de l'ordre de 0,22 µm, pour extraire ledit agent viral des fèces.

Selon un mode de mise en oeuvre du procédé d'isolement de l'agent viral susdit, le traitement de centrifugation est avantageusement constitué par une opération de centrifugation à 5000 - 8000 g environ pendant 10 minutes environ.

50 Selon un autre mode de mise en oeuvre du procédé d'isolement de l'agent viral susdit, préalablement aux opérations de centrifugation et de filtration susdites, l'extrait de fèces est soumis à un traitement par ultra-sons ou à un traitement de dissociation chimique.

La présente invention a également pour objet un autre procédé d'obtention de l'agent viral susdit, qui est caractérisé en ce que des hépatocytes ou des lignées cellulaires continues d'hépatocytes sont inoculés  
 55 par un extrait de fèces d'un patient atteint d'hépatite NANB ou par un extrait de foie d'un singe (de préférence Saimiri) inoculé par un extrait de fèces de patients souffrant d'hépatite NANB, et cultivés jusqu'à confluence de la culture, à partir de laquelle est réalisée une sous-culture, qui est centrifugée après plusieurs passages, pour recueillir l'agent viral recherché.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux de ce procédé, le culot de centrifugation est repris par un tampon approprié pour être soumis à un traitement par ultra-sons qui libère dans le surnageant, l'Ag NAB.

La présente invention a en outre pour objet un procédé de détection d'antigène NAB présent dans les fèces de patients atteints d'hépatite virale NAB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre des immunoglobulines isolées de sérum de patients convalescents, ou de singes préalablement infectés par le virus de l'hépatite NAB, qui sont incubées avec des extraits de fèces de mammifères présumés atteints d'hépatite virale NAB, pour former un immunocomplexe antigène-anticorps qui est révélé à l'aide d'un test de détection approprié de la présence de l'antigène NAB dans lesdites fèces, tel qu'un test ELISA ou un test radioimmunologique, notamment.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de détection d'antigène NAB dans les fèces de patients atteints d'hépatite NAB, celui-ci est caractérisé en ce que des extraits de fèces de mammifères présumés infectés par le virus NAB, obtenus par centrifugation et filtration des fèces de ces mammifères, sont incubés avec une fraction d'IgM anti-NAB isolée de sérums de patients, ou de singes infectés artificiellement par des extraits de fèces de patients humains connus pour être atteints d'hépatite NAB, laquelle fraction est fixée sur un support solide, puis avec une fraction d'IgG immune anti-virus NAB purifiée selon l'invention, d'un mammifère, de la même espèce ou d'une espèce voisine, marquée avec un marqueur enzymatique tel que la  $\beta$ -galactosidase ou la peroxydase, la réaction étant développée à l'aide d'un substrat révélateur approprié tel que l'orthonitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside ou l'orthophénylène-diamine, en tampon acide. Le marquage peut être fait également avec un élément fluorescent ou radioactif selon les méthodes connues de l'homme de l'Art.

Conformément à l'invention, des souches de l'agent viral conforme à l'invention, isolées comme décrit dans ce qui précède et ci-après, et caractérisées comme indiqué plus loin, ont été déposées auprès de la COLLECTION NATIONALE DE CULTURE DE MICROORGANISMES tenue par l'INSTITUT PASTEUR, en date du 30 Octobre 1986, à savoir :

- une souche d'agent viral isolé de fèces d'un malade atteint d'hépatite NAB sporadique, dite "Souche Clamart", qui a été affectée du Numéro de dépôt : I-617,
- une souche d'un agent viral isolé de fèces d'un malade atteint d'hépatite NAB épidémique, dite "Souche ivoirienne", qui a été affectée du Numéro de dépôt : I-616.

Selon un mode de mise en oeuvre du procédé de détection des anticorps présents dans le sang du malade ou du convalescent ou dans des produits utilisés en transfusion sanguine ou dans des fractions dérivées de sang, ayant été en contact avec le virus agent causal de l'hépatite non A non B, tel que défini selon la présente invention, dont les souches I-617 et I-616 et celles présentant une réaction immunologique croisée avec les deux souches de référence, le sérum du malade ou du patient convalescent est mis en contact avec la préparation virale purifiée (ou avec une fraction de celle-ci) telle que recueillie dans les conditions mentionnées ci-dessus, après centrifugation et isolement de la bande correspondant à une densité de 1,30.

Ladite préparation virale est fixée, par exemple, sur les parois d'une microplaque selon les techniques connues.

Le complexe Ag/Ac est révélé par une préparation d'anti-immunoglobulines humaines marquées par un marqueur adéquat, par exemple une enzyme.

Un système analogue peut être utilisé pour caractériser une activité anticorps dans les IgM d'un patient en vue d'un diagnostic sérologique très précoce de la maladie, en utilisant des anti-IgM humaines, ou mieux en captant les IgM d'un sérum en les faisant réagir avec le virus ou ses fractions et en caractérisant l'Ag fixé sur l'IgM du malade.

La présente invention a, de plus, pour objet des réactifs immunologiques pour la détection de l'hépatite NAB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, qui sont caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des immunoglobulines isolées du sérum de convalescents humains ou de sérum de singes préalablement infectés par le virus de l'hépatite NAB, lesquels réactifs sont aptes à former un immunocomplexe antigène-anticorps lorsqu'ils sont incubés avec des extraits de fèces contenant des antigènes d'hépatite NAB.

Selon un mode de réalisation avantageux des réactifs immunologiques conformes à la présente invention, ceux-ci sont aptes à former un immunocomplexe par incubation avec des extraits de fèces d'individus contaminés par du virus NAB selon l'invention et purifiés par centrifugation et filtration.

La présente invention a également pour objet un réactif immunologique pour la détection de l'hépatite virale NAB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, caractérisé en ce qu'il est constitué par un anticorps anti-hépatite NAB préparé à partir de sérums d'animaux artificiellement infectés par ingestion d'extraits de fèces de patients atteints d'hépatite virale NAB, ou de sérums d'animaux immunisés par le

virus NANB ou ses fractions purifiées.

Selon un mode de réalisation avantageux de ce réactif immunologique, l'anticorps anti-hépatite NANB (IgM ou IgG) est fixé sur un support solide.

Selon une modalité avantageuse de ce mode de réalisation, le support solide revêtu d'anticorps anti-hépatite NANB est en outre recouvert d'une protéine, telle que BSA en particulier, de préférence en solution tamponnée.

Le réactif immunologique conforme à la présente invention est mis en oeuvre dans le procédé de détection d'antigène NANB conforme à l'invention en l'incubant avec des extraits de fèces ou des produits sanguins ou du sérum de patients, puis avec des fractions d'anticorps purifiés à partir de sérums de patients convalescents d'hépatite NANB épidémique, ou de sérums d'animaux infectés artificiellement, immunisés contre ce virus, lesdits anticorps étant marqués par une enzyme convenable telle que la  $\beta$ -galactosidase, par exemple. La réaction est développée à l'aide d'un substrat révélateur approprié tel que l'orthonitrophényl- $\beta$ -galactopyranoside.

Le procédé de diagnostic in vitro de la présence du virus de l'hépatite NANB conforme à la présente invention consiste donc à mettre en contact un sérum ou un autre milieu biologique d'un patient dont on cherche à établir le diagnostic, avec au moins une des protéines ou des glycoprotéines du virus NANB ou avec un lysat viral ou avec un extrait viral, puis à détecter la réaction immunologique par la méthode ELISA ou par une autre méthode immunoenzymatique ou une méthode par immunofluorescence, qui peut mesurer directement ou indirectement l'immunofluorescence ou la réaction immunoenzymatique.

C'est la raison pour laquelle la présente invention englobe également les extraits viraux marqués, qu'ils soient marqués par une enzyme, par fluorescence ou qu'ils soient marqués par une radioisotope.

Les méthodes d'immunodétection comprennent, comme on le sait :

- le dépôt de quantités d'extrait spécifique ou des protéines virales conformes à l'invention, dans ou sur un support tel que les puits d'une microplaque de titration ;
- l'introduction de dilutions croissantes du sérum à diagnostiquer sur ledit support, tel que lesdits puits ;
- l'incubation du support tel que la microplaque susdite ;
- le lavage soigneux du support tel que la microplaque susdite à l'aide d'un tampon convenable ;
- l'introduction d'anticorps anti-immunoglobuline humaine marqués spécifiques dans ou sur le support tel que les puits de la microplaque susdite, le marquage étant réalisé par une enzyme choisie parmi celles capables d'hydrolyser un substrat de telle manière que l'absorption de radiations par ce dernier soit modifiée au moins dans une bande spécifique de longueurs d'ondes, et
- la détection, de préférence de manière comparative, par rapport à un témoin, de la quantité de substrat hydrolysé, à la fois par la mesure du produit biologique dangereux et par la présence effective de la maladie.

La présente invention a également pour objet un kit - ou ensemble - prêt à l'emploi pour la réalisation du procédé de diagnostic (recherche de l'anticorps ou du virus NANB) conforme à l'invention, défini plus haut, lequel kit est caractérisé en ce qu'il comprend :

- un extrait ou une fraction purifiée de l'agent viral conforme à l'invention, lequel extrait ou fraction est marqué, par exemple par un radioisotope, une enzyme ou par immunofluorescence ;
- des anti-immunoglobulines humaines ou une protéine A éventuellement fixées sur un support insoluble dans l'eau tel que sphères d'agarose ou de latex, magnétiques ou non ;
- des tampons et, si nécessaire, des substrats pour visualiser les marquages.

La caractérisation de certains des antigènes qui entrent dans la composition de l'agent viral isolé conformément à la présente invention a été réalisée dans un premier temps sur la souche Clamart, en procédant comme décrit ci-après.

La souche Clamart a été isolée à partir de selles d'un patient atteint d'hépatite NANB sporadique.

Le surnageant desdites selles a été centrifugé en gradient de chlorure de césium dont la bande contenant l'antigène viral purifié comme défini plus haut a été recueillie et sa densité déterminée comme étant de 1,30.

Les épitopes reconnus dans le test de diagnostic défini plus haut, sont portés par ces antigènes, qui peuvent à ce titre, être utilisés dans ledit test.

Le réactif apte à être utilisé pour la détection d'hépatite NANB conforme à la présente invention, est préparé et utilisé comme décrit ci-après :

Des singes sont artificiellement infectés par ingestion de fèces de patients atteints d'hépatite NANB épidémique.

Les sérums de singes utilisés sont ceux collectés le 27ème jour après l'infection, à partir des singes infectés artificiellement comme indiqué plus haut. Ces sérums sont chromatographiés sur une colonne de gel de dextrane dans un tampon Tris-NaCl 0,1M, pH 8 pour isoler les anticorps recherchés qui sont des

IgM anti-NANB.

Les Igm ainsi isolées sont fixées sur des supports solides, tels que de préférence des plaques de PVC, en mettant les IgM à des concentrations d'environ 10 à 50 µg de protéines par ml de PBS, en contact avec les supports solides pendant 18 à 24 heures à + 4°C. Il est préféré que ces plaques de PVC revêtues des  
 5 IgM anti-hépatite NANB, soient ensuite recouvertes d'une couche de PBS contenant 1 % de BSA (sérumalbumine bovine) et 0,1 % de "Tween 20". Les plaques de PVC doublement revêtues sont alors prêtes à l'usage en tant que réactif de diagnostic utile pour la détection de l'agent viral associé à l'hépatite NANB.

Le procédé de diagnostic conforme à la présente invention commence de préférence par l'incubation  
 10 desdites plaques de diagnostic avec des extraits de fèces à diagnostiquer, pendant 1 heure à 37°C. Les plaques sont ensuite incubées avec des fractions d'IgG obtenues par purification de sérums de patients convalescents d'hépatite NANB épidémique, par chromatographie sur une colonne de DEAE-Trisacryl et marquées par une enzyme, de préférence la bêta-galactosidase, d'hydrolyse d'un substrat révélateur en présence duquel a lieu la réaction, et qui est de préférence l'orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside.

La méthode de détection conforme à l'invention peut également consister à rechercher la présence  
 15 d'anticorps NANB dans le sérum ou autre milieu biologique d'un malade ou d'un convalescent ; en pareil cas, le sérum est mis en contact avec la préparation virale conforme à l'invention - collectée par exemple après centrifugation et isolement de la bande de densité à 1,28-1,32 g/cm<sup>3</sup> correspondante -, ou avec une fraction de cette préparation virale ; cette préparation virale, ou l'une de ses fractions, est mise en réaction  
 20 avec une préparation d'IgM ou d'IgG qui revêt les parois d'une microplaque d'une manière connue de l'Homme de l'Art. La formation d'un immunocomplexe (virus ou fraction de celui-ci - anticorps humains anti-virus) s'oppose alors à la révélation de l'antigène qu'il contient par l'IgG de convalescent marquée par exemple par une enzyme.

La recherche d'anticorps à l'aide de cette méthode de détection peut être effectuée dans le sang de  
 25 malades ou de convalescents, dans les produits utilisés dans les transfusions sanguines et dans les fractions dérivées du sang de personnes ayant été exposées à l'agent causal de l'hépatite NANB tel que défini plus haut, parmi lesquelles les souches I-617 et I-616 et celles présentant une réaction immunologique que croisée avec ces deux souches de référence, notamment la souche isolée de patients atteints d'hépatite NANB post-transfusionnelle, dont les propriétés immunologiques sont identiques à celles de la  
 30 souche I-617, et qui est identifiée comme souche virale "H-SET" déposée le 5 Février 1987 sous le N° 87.02.05.02 auprès de la Collection ECACC (Grande-Bretagne).

Bien que les données cliniques et épidémiologiques aient pu suggérer que la forme épidémique de l'hépatite NANB présentée par des patients atteints d'hépatite NANB épidémique est due à un virus différent de celui qui est à l'origine de l'hépatite NANB post-transfusionnelle transmise par injection  
 35 parentérale, conformément à la présente invention l'inventeur a pu isoler de patients atteints d'hépatite NANB post-transfusionnelle une nouvelle souche de virus NANB dont les propriétés immunologiques sont pratiquement identiques à celles des souches déposées le 30 Octobre 1986 sous les N° I-616 et I-617 auprès de la CNCM de l'Institut Pasteur. Des tests sérologiques très sensibles de présence de virus HAV et HBV ont permis d'exclure ces deux virus en tant qu'agents étiologiques et d'exclure, de même, d'autre  
 40 virus hépatotropes tels que le cytomégalo virus, le virus d'Epstein-Barr et le virus de la fièvre jaune.

La présente invention a en outre pour objet un nouvel agent viral purifié impliqué dans les formes sporadique, épidémique et post-transfusionnelle de l'hépatite NANB. Ce virus se distingue des virus HAV et HBV en ce qui concerne l'homologie antigénique de ses protéines en tant que matériel génétique.

Les compositions préparées conformément à la présente invention (antigènes viraux purifiés, protéines  
 45 recombinantes obtenues par l'expression du virus NANB dans des cellules procaryotes ou eucaryotes ou peptides synthétiques déduits de la séquence du génome) peuvent être utilisées pour le diagnostic de l'hépatite NANB ou pour la vaccination pro pre à induire la synthèse d'une réponse immune protectrice après administration à l'hôte.

La présente invention englobe toutes les compositions de ce type contenant un antigène présentant des  
 50 propriétés immunologiques équivalentes à celles du virus NANB Clamart (CNCM I-617) ou Côte d'Ivoire (CNCM I-616). En effet, deux protéines ou antigènes sont considérés comme équivalents dans le cadre de la présente invention lorsqu'ils sont capables d'être reconnus par les mêmes anticorps. Les produits exprimés par des séquences correspondantes du matériel génétique codant des séquences génétiques correspondantes sont, par suite, compris dans le cadre de tels antigènes équivalents.

La présente invention englobe également les sérums pouvant être produits à partir d'animaux par  
 55 inoculation à ces derniers de virus NANB à l'aide des compositions précitées. En particulier, la présente invention englobe les anticorps polyclonaux spécifiquement dirigés contre chacun des antigènes du virus NANB. Elle englobe également les anticorps monoclonaux susceptibles d'être obtenus par des méthodes



appropriées et dirigées plus spécifiquement contre les antigènes du virus NANB.

Conformément à la présente invention, l'utilisation du virus ou de son lysat ou d'une fraction de ce lysat peut être envisagée pour la préparation d'anticorps monoclonaux et le lysat viral ou les fractions de celui-ci ou les protéines purifiées à partir de ce virus, du lysat ou de ses fractions, peuvent être utilisés pour la  
5 recherche d'anticorps dans le sérum des patients par mise en œuvre de tests classiques de type RIPA, ELISA ou Western blot (immunoempreinte).

Ces anticorps polyclonaux et monoclonaux peuvent être utilisés dans un grand nombre d'applications au nombre desquelles on peut citer la neutralisation de l'antigène correspondant ou du virus total. Ils peuvent être utilisés pour détecter des antigènes viraux dans des préparations biologiques ou pour purifier  
10 des antigènes correspondants.

La présente invention englobe également tout virus de l'hépatite NANB équivalent présentant les mêmes caractéristiques immunologiques. Les travaux menés par l'inventeur ont montré la relation immunologique entre les matériels antigéniques isolés d'extraits de fèces de malades atteints respectivement d'hépatite NANB épidémique, sporadique et post-transfusionnelle.

C'est ainsi que la souche de type Clamart (déposée sous le N° I-617 auprès de la CNCM et également déposée auprès de la Collection ECACC sous le N° 87.02.05.02) a été isolée à partir des selles d'une malade qui présentait une hépatite aiguë NANB dûment caractérisée comme hépatite NANB transfusionnelle. Les selles contenaient l'antigène conforme à l'invention, également caractérisé, conformément à l'invention, dans les hépatites épidémiques (Côte d'Ivoire) et sporadiques (France).

Un antigène associé au virus de l'hépatite NANB a été caractérisé pendant 15 jours à la phase aiguë de la maladie. D'autres cas similaires ont été observés avec caractérisation du même antigène dans les selles et isolement d'un virus présentant les caractéristiques immunologiques identiques aux virus I-616 et I-617.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples de mise en œuvre sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Au cours d'une première étape, deux singes *Cercopithecus aethiops* et un singe *Erythrocebus patas* ont été inoculés par voie orale par 2 ml d'un mélange d'un extrait aqueux à 10% de fèces de patients ivoiriens présumés atteints d'hépatite NANB épidémique, collectées au cours des premiers jours ayant suivi l'apparition des symptômes. Le mélange avait été préalablement centrifugé et filtré à travers des filtres Millipore de 0,22  $\mu$ m pour éliminer les bactéries et les parasites. Les échantillons de sérum et les  
30 échantillons de fèces de ces singes ont été collectés d'une part avant l'administration de l'extrait de fèces et d'autre part le vingt-septième jour après l'inoculation. Les fonctions hépatiques de ces singes n'ont pas été étudiées; ces animaux ne présentaient pas de manifestations cliniques évidentes. Un singe Saimiri a également été inoculé dans les mêmes conditions par 0,5 ml d'un extrait de fèces provenant d'un patient ivoirien différent de ceux utilisés pour les singes verts d'Afrique. Un second singe Saimiri qui avait été  
40 inoculé trois mois auparavant par une préparation fécale de virus d'hépatite A et séroconverti l'aide d'anticorps IgM anti-HAV au jour 29, a été inoculé par voie intraveineuse par 0,5 ml du même échantillon de fèces filtré. Les deux singes Saimiri ont été saignés deux fois par semaine pour effectuer des examens biochimiques et sérologiques et leurs fèces ont été examinées quotidiennement. Les deux singes Saimiri sont morts au jour 28, sans avoir présenté de symptômes particuliers. Aucun des singes n'avait présenté  
45 de preuve biochimique convaincante d'un dysfonctionnement hépatique et l'examen histologique effectué post-mortem a montré une congestion du foie sans lésion du parenchyme. Les sérums de ces cinq singes ont été fractionnés dans du tampon Tris NaCl 0,1M, pH 8, sur du "Sephacryl S 300" et les fractions contenant des IgM et des IgG ont été collectées. Elles ont été utilisées en tant qu'anticorps récepteurs dans un test immunoenzymatique. L'IgM a été choisie pour sa capacité de capture élevée et pour empêcher les  
50 réactions faussement positives dues à un facteur rhumatoïde ou analogue au facteur rhumatoïde, qui a été reconnu comme stimulant l'antigène NANB.

En fait, on pourrait également utiliser l'IgG bien que son bruit de fond soit un peu plus élevé que celui de l'IgM et sa spécificité déficiente pour certaines préparations.

Pour révéler la fixation d'antigène de fèces sur l'anticorps en phase solide, des IgG provenant de sérums de convalescents ont été fractionnées par chromatographie sur DEAE-trisacryl, après précipitation  
55 par du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Les IgG ont été conjuguées à la  $\beta$ -galactosidase ou à la peroxydase. Des IgG marquées ont été utilisées pour la détection de l'antigène : une préparation d'IgG provenant d'un patient ivoirien convalescent d'une hépatite NANB épidémique; une préparation d'IgG prélevée chez un patient algérien

guéri, au cours de l'épidémie de Medea en 1981-1982; enfin l'IgG d'un singe Cercopithèque inoculé expérimentalement. Les préparations d'IgG des trois origines ont donné des résultats équivalents. Pour chaque singe, on a utilisé de l'IgM de préinoculation en phase solide comme témoin de spécificité d'IgM de post-inoculation. De l'IgG humaine marquée non-immune a été utilisée comme témoin de marquage d'Ag. Les fèces de singes inoculés ont été examinées pour établir la présence d'un Ag présumé NANB dans le test ELISA. Une activité antigénique a été détectée dans les fèces des deux singes Saimiri (cf. Tableau 1). L'application d'un traitement par ultra-sons a permis d'augmenter la quantité d'antigène détecté et a augmenté la sensibilité de la méthode. L'Ag est apparu dès le quatrième jour après l'inoculation et a persisté jusqu'au treizième jour.

Le Tableau 1 montre l'Ag NANB détecté dans les fèces de singes infectés expérimentalement par des extraits de fèces provenant de patients atteints de NANBH épidémique.

La détection a été réalisée comme suit, en mettant en oeuvre la technique ELISA : des immunoplaques NUNC ont été revêtues de 100 µl de 50 µg/ml de fraction d'IgM, échantillonnées 27 jours après inoculation, dans une solution physiologique de tampon phosphate (PBS) pendant une heure à 37°C et une nuit à 4°C. Après plusieurs lavages, les plaques ont été recouvertes de 200 µl de PBS contenant 1% de sérum-albumine bovine et 0,1% de Tween 20, pendant trois heures à 37°C. Après lavage, 100 µl des extraits de fèces (1/10 V/V) filtrés sur un élément de porosité 0,22 µm sont incubés sur les IgM du revêtement, à 37°C pendant une heure, puis une nuit à 4°C. Après plusieurs lavages, 100 µl d'IgG de singe immun marquée à la peroxydase à 5 mcg/ml dans 1 % de BSA + 0,1 % de Tween 20 dans du tampon Tris sodique, pH 7,6 (TNB) contenant 0,1 % de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ont été utilisés pour la détection de l'Ag. Au bout d'une heure d'incubation à 37°C et plusieurs lavages, la réaction a été développée à l'aide de 100 µl d'orthophénylène-diamine dans 0,005 M de tampon citrique pH 5,6, avec 1 µl/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les résultats obtenus sont exprimés par le rapport entre l'échantillon étudié et la moyenne de cinq échantillons négatifs (P/N). Le bruit de fond des échantillons négatifs a été de l'ordre de 0,04-0,06 en densité optique (DO) à 492 nm. Il est plus élevé si le Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a été omis, mais, dans ce cas, des quantités de réactifs plus faibles doivent être mises en réaction. Les échantillons dont le rapport P/N 2,1, ont été considérés comme positifs. Les fèces (1/10 poids/poids) qui ont été examinées étaient de deux types : celles ayant subi un traitement aux ultra-sons et celles n'ayant pas subi un tel traitement; le traitement aux ultra-sons appliqué est de trois minutes à 4°C, avec une intensité de sortie de 4 avec l'appareil de BRENSON pour des volumes de 2 à 3 ml avant centrifugation et filtration à travers un élément de porosité de 0,22 µm. Les résultats positifs sont soulignés dans le Tableau 1. Les fèces d'un singe Saimiri ayant reçu de l'extrait de fèces d'un patient atteint d'une maladie du foie non-infectieuse ont servi de témoin et ont constamment donné des résultats négatifs.

TABLEAU 1

Nombre de jours après inoculation	P/N sans traitement par ultra-sons		P/N avec traitement par ultra-sons	
	Singe N° 1 (inoculation par voie intraveineuse)	Singe N° 2 (inoculation par voie orale)	Singe N° 1	Singe N° 2
0	1,15	1,14	1,18	1,07
4	<u>2,47</u>	1,60	<u>5,10</u>	0,79
7	<u>6,48</u>	<u>3,28</u>	<u>8,78</u>	<u>5,52</u>
9	3,64	<u>2,24</u>	<u>4,72</u>	<u>5,82</u>
11	1,12	1,40	1,95	5,20
13	1,30	1,46	<u>2,40</u>	0,80
15	1,51	1,68	0,93	0,90
19	1,53	1,51	1,20	0,80

Une deuxième étape a consisté à étudier des fèces de patients atteints d'une hépatite NANB aiguë présumée, aussi bien sous sa forme épidémique (patients ivoiriens) que sous sa forme sporadique (patients français). Le diagnostic de l'hépatite NANB a été établi conformément aux critères immunologiques classiques des trois types d'infections par des virus d'hépatite (A,B, delta) : présence ou absence d'IgM et d'IgG anti-HAV pour l'infection par le virus A; HBsAg, anti-HBc et IgM anti-HBc, anti-HBs, pour l'infection par HBV; les Ag delta et anti-delta pour l'infection par HDV, le cas échéant. Pour les patients ivoiriens, les marqueurs de la fièvre jaune ont été recherchés. On a également recherché chez tous ces patients l'infection par le cytomégalovirus par immunocapture d'anticorps IgM et l'infection par le virus d'Epstein-Barr, par détection d'IgM anti-VCA dans les taches immunofluorescentes. L'Ag associé à la NANB a été détecté aussi bien dans les cas épidémiques que dans les cas sporadiques (cf. Tableau 2). Il n'a pas été détecté d'Ag dans 90 extraits témoins de patients européens présentant d'autres troubles gastro-intestinaux. Dans la plupart des cas, ces résultats ont été confirmés plusieurs fois avec différentes IgM ou IgG en phase solide et avec différentes IgG marquées. Les mêmes échantillons positifs ont été étudiés avec l'IgM préimmune recouvrant une plaque et il n'a pas été détecté d'antigène. Il en résulte que l'Ag détecté paraît étroitement lié au virus NANB.

Le Tableau 2 ci-après illustre la détection d'Ag NANB dans les fèces de patients atteints d'hépatite NANB épidémique (de Côte d'Ivoire) et sporadique (de France). 90 fèces de patients suspectés d'infections gastro-intestinales ont été utilisées comme témoins. Tous les échantillons présumés NANB et 17 des 90 témoins ont été soumis à un traitement par ultra-sons. De l'anticorps (Ac) humain marqué à la peroxydase ou la  $\beta$ -galactosidase, a été utilisé comme traceur d'Ag.

TABLEAU 2

	Echantillons de fèces de Côte d'Ivoire : cas épidémiques	Echantillons de fèces de France : cas sporadiques	Témoins de France
AG NANB positif	17	7	0
AG NANB négatif	44	10	90

Pour vérifier que l'Ag détecté est effectivement étroitement lié au virus NANB, au cours d'une troisième étape, des lignées cellulaires continues d'origine hépatocytiques, PLC/PRF 5 et HEP G2, et des cellules normales humaines fibroblastiques MRC 5, ont été inoculées dans du milieu de DULBECCO contenant 10% de sérum de veau foetal, par un extrait de fèces d'un malade atteint d'hépatite NANB. Après confluence de la culture, une sous-culture a été réalisée après addition d'EDTA-trypsine. Dans certains cas, des substances toxiques présentes dans les fèces provoquent la mort des cellules précocement lors de la première semaine, tandis que d'autres fèces non toxiques pour les lignées cellulaires, induisent la mort des cellules après plusieurs passages. Cet effet léthal spécifique a été observé uniquement avec la lignée cellulaire PLC/PRF 5 mais ne l'a pas été avec la lignée cellulaire HEP G2 et les cellules MRC 5. Après traitement des cellules aux ultra-sons et filtration sur porosité 0,22  $\mu$ m, de l'Ag NANB a été détecté dans le surnageant de PLC/PRF 5 infectées mais pas dans le surnageant des HEP G2 infectées dans les mêmes conditions.

Pour des extraits de foie de singes inoculés, on n'a pas observé de toxicité cellulaire après inoculation et les cellules PLC/PRF 5 ont présenté une positivité antigénique de la même manière que dans le cas d'échantillons de fèces (cf. Tableau 3).

Le Tableau 3 illustre la détection d'Ag NANB dans la lignée cellulaire d'hépatome inoculée par un extrait de fèces d'un patient ivoirien souffrant d'hépatite NANB épidémique et par un extrait de foie d'un singe Saimiri infecté (N° 1).

L'extrait de foie a été préparé dans du PBS (10% poids/poids) et homogénéisé à l'aide de l'"Ultraturax". Après centrifugation, le culot a été remis en suspension dans 4 fois son volume de TNB et soumis à un traitement aux ultra-sons en présence de 0,005 mg/ml de chlorure de phénylméthylsulfonide (PMSF).

Un extrait de foie d'un singe Saimiri inoculé par un extrait de fèces de patients souffrant d'une maladie de foie non-infectieuse a servi de témoin.

Après trois passages, les cultures cellulaires inoculées ont été centrifugées. Le culot a été repris dans du TNB et après addition de PMSF, les cellules ont été soumises à un traitement aux ultra-sons. Les chiffres indiquent le rapport P/N.

TABLEAU 3

Lignée cellulaire d'hépatome	Cellules inoculées par de l'extrait de fèces de patient ivoirien	Cellules inoculées par de l'extrait de foie de singe Saimiri infecté	Cellules inoculées par de l'extrait de foie de singe Saimiri témoin	Cellules non-inoculées
PLC/PRF 5	8,19 *	4,39	2	1,01
HEP G2	1,62	1,14	2	1,07

\* après dilution à 1/100 P/N : 6,29.

Il semble ressortir des essais préliminaires de marquage par immunofluorescence qu'une cellule sur 50 environ, seulement, soit infectée, dans les conditions expérimentales.

Une quatrième étape a eu pour objet de purifier l'antigène associé au virus, provenant d'échantillons de fèces de différentes origines. Trois profils de répartition d'antigène ont été observés et sont représentés à la figure 2 annexée qui montre que dans des échantillons fraîchement utilisés, l'activité antigénique apparaît sous la forme d'une bande à une densité de 1,29-1,32 g/cm<sup>3</sup>. Certains des échantillons de fèces conservés à + 4°C pendant quelques mois, ou des échantillons frais ayant subi un traitement par ultra-sons, n'ont présenté d'activité antigénique qu'à une densité de 1,12-1,19 g/cm<sup>3</sup>, tandis que d'autres présentaient une activité aux deux densités.

La figure 2 représente la répartition de l'antigène dans le gradient de CsCl après ultracentrifugation isopycnique, obtenue en procédant comme suit :

3 ml d'échantillons de fèces (10 % dans RPMI) ont été fractionnés après filtration à travers un élément filtrant de 0,22 µm de porosité, dans un gradient de CsCl de densité comprise entre 1,1 et 1,8 g/ml. La centrifugation isopycnique (48 heures) à 78000 g a été effectuée dans des tubes de 12 ml (1,2,3,2, 0,5, 0,5 ml de CsCl de densité 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5 et 1,6 respectivement). 0,6 ml de fractions ont été collectés et testés pour déterminer la présence d'antigène NANB après deux dilutions.

Dans la figure 2:

A désigne les fèces fraîches

B et C des fèces conservées ou traitées aux ultra-sons.

Du matériel antigénique à faible densité apparaissant dans ces conditions est supposé résulter d'un effet de décomposition par des enzymes contenues dans les fèces ou par un traitement physique. Les fractions de CsCl à antigénicité positive ont été soumises à une ultracentrifugation dans un gradient de saccharose variant de 10 à 60 % poids/volume et les fractions réactives ont été étudiées à l'ultramicroscopie. L'antigène NANB a été trouvé à 40-41,5 % de saccharose et de façon prédominante à 28-28 % de saccharose. Sept préparations obtenues à partir de 9 échantillons à antigénicité NANB positive, comportaient des particules virales : une provenant d'un singe Saimiri inoculé (le second singe n'a pas été examiné), deux provenant de deux des trois patients atteints d'hépatite NANB épidémique aiguë (Côte d'Ivoire), quatre provenant de quatre des cinq patients atteints d'hépatite NANB sporadique (France). Deux types de particules virales sphériques ont été observées : des particules de grandes dimensions, de l'ordre de 75 nm de diamètre, qui présentent une structure à double membrane, et des particules de dimensions plus petites, homogènes, de 25 à 30 nm de diamètre environ, sans aucune structure interne définie. Une structure tubulaire de 15 nm de diamètre (ou de largeur) et dont la longueur peut atteindre 1 µm, plus ou moins fixée aux particules, a été observée et est représentée à la figure 3 annexée. Certaines images donnent l'impression que des tubules partent de l'enveloppe des particules virales de grandes dimensions. Les particules les plus caractéristiques ont été observées dans des échantillons frais n'ayant pas subi de traitement par ultra-sons. Des particules sphériques de grandes dimensions ont pu être observées pour la plupart dans des fractions de densité comprise entre 1,29 et 1,32 g/cm<sup>3</sup> et dans la fraction de 40-41,5 % de saccharose du gradient de saccharose, tandis qu'on n'a pu observer que des particules de dimensions moindres dans les fractions de CsCl présentant une densité comprise entre 1,12 et 1,19 g/cm<sup>3</sup> et dans la fraction du gradient de saccharose à 28-28 % de saccharose. Il n'a pas encore pu être établi si les particules les plus petites et de densité plus basse représentent une forme de libération du virus de départ. Six échantillons de fèces à antigénicité négative ont également été étudiés simultanément de la même

manière pour servir de témoins. On n'a trouvé dans aucune de ces préparations une structure ayant l'aspect de particules.

Une dernière étape a permis de mettre en évidence que la détection d'Ag NANB dans les fèces démontre que le virus NANB épidémique est fréquemment impliqué dans l'hépatite NANB sporadique. De l'Ag NANB associé au virus a été détecté dans sept échantillons de fèces parmi 17 patients examinés atteints d'hépatite NANB sporadique aiguë (cf. figure 3). Des examens sérologiques ont confirmé ces résultats : parmi huit patients dont on disposait des sérums, sept d'entre eux présentaient un sérum avec l'anticorps anti-NANB.

La figure 3 illustre la caractérisation de particules virales au microscope électronique dans les fèces de singes infectés par NANB et de patients atteints d'hépatite NANB.

Après ultracentrifugation isopycnique comme décrit en relation avec la figure 2, les fractions positives ont été mélangées, puis dialysées contre du TNB, puis elles ont été soumises à une ultracentrifugation zonale dans un gradient de saccharose (10-60 % poids/poids) à 78000 g pendant 5 heures. Les fractions positives ont été mélangées, dialysées, concentrées et examinées au microscope électronique. Une goutte de préparation virale a été étalée sur une grille de 200 mesh revêtue de carbone et après absorption sur papier-filtre, une goutte de 2 % d'acétate d'uranyle dans de l'eau distillée a été ajoutée. Au bout de deux minutes, la grille a été essuyée avec du papier-filtre et étudiée au microscope JEM 100 C x II.

Les figures 4 et 5 annexées représentent des coupes vues au microscope électronique après coloration par l'acétate d'uranyle de cellules PLC/PRF 5 inoculées avec un extrait de selles d'un patient souffrant d'hépatite non A non B chez lequel l'Ag a été détecté dans ses selles selon les techniques décrites plus haut.

Les particules virales sont retrouvées dans le noyau et le cytoplasme sous forme de "réseaux cristallins" ; le diamètre de la particule est très constant : 74 à 75 nm. La figure 4 est une vue à grossissement  $\times 16000$  et la figure 5 une vue à grossissement 54000.

Comme les épidémies d'hépatite NANB sont habituellement observées dans les pays en voie de développement, il a paru intéressant d'examiner si les mêmes virus jouent, dans ces pays, un rôle dans les cas sporadiques. C'est pourquoi 28 sérums de patients marocains souffrant d'hépatite NANB aiguë sporadique ont été examinés pour déterminer s'ils contiennent des anticorps vis-à-vis du virus NANB épidémique. 68 % des patients se sont avérés présenter des anticorps anti-virus NANB épidémique tandis que les mêmes anticorps n'ont été détectés que dans 10 % de sérums de donneurs de sang, dans le même pays.

Le Tableau 4 ci-après illustre la détection d'anticorps spécifiques vis-à-vis de l'antigène NANB dans des sérums de patients souffrant d'hépatite NANB sporadique. La présence d'anticorps a été démontrée par inhibition de la réaction dans les conditions décrites dans le Tableau 1 ci-dessus. La réaction a été réalisée en incubant 50  $\mu$ l d'un extrait de référence provenant de fèces de singe infecté, pendant une heure à 37°C et une nuit à 4°C, avec 50  $\mu$ l du sérum à examiner. Toutes les autres étapes de la réaction ont été réalisées de la même manière que pour la détection de l'Ag. Le rapport P/N de cet antigène de référence était de l'ordre de 6-8. 24 sérums humains normaux non dilués ont été testés dans une réaction d'inhibition contre l'Ag de référence comparativement au PBS ; aucun d'entre eux n'a exercé d'action inhibitrice. Ultérieurement, 50  $\mu$ l d'un mélange de ces sérums ont servi à établir la positivité à 100 % de la réaction. Les échantillons testés ont été considérés comme positifs lorsque l'inhibition était supérieure à 50 %.

L'Ag NANB a été détecté dans les fèces de cinq patients souffrant d'hépatite NANB aiguë ; on n'a pas trouvé d'anticorps dans l'une d'entre elles. Chez deux autres patients, la maladie aiguë datait respectivement de 9 et de 3 mois et il n'a plus pu être détecté d'Ag dans les fèces. Le dernier des cinq patients avait présenté dans le passé une hépatite NANB avec de l'anticorps décelable qui a disparu au bout de 3 ans.

TABLEAU 4

5	Source de sérum Pays	Donneurs de sang	Personnel du Labo- ratoire	Patients en hémodyse	Hépatite NANB sporadique
10	MAROC	8/78	0/12	1/12	19/28
	FRANCE	0/26			7/8

15

Comme le montre le Tableau 4 ci-dessus, l'hémodialyse ou un travail de laboratoire impliquant la manipulation de sang humain ne paraît pas augmenter le risque d'infection par le virus NANB. Le fait que l'on utilise des Ac préparés à partir de singes infectés par un virus NANB épidémique, pour la détection d'Ag liés à un virus NANB sporadique, montre qu'il s'agit du même virus.

20 Les différentes étapes de l'étude qui viennent d'être décrites ont permis de caractériser un nouvel agent viral impliqué dans l'hépatite NANB. Cet agent viral semble être responsable aussi bien de la forme épidémique que de la forme sporadique et de la forme post-transfusionnelle de l'hépatite NANB.

Il est différent du virus HAV :

25 1) Une infection par le virus NANB épidémique a été observée chez un singe et chez des patients présentant une immunité anti-HAV ;

2) Les marqueurs usuels de l'infection aiguë (IgM anti-HAV) n'ont pas été détectés ;

3) Ce virus induit une réponse immune spécifique et les anticorps n'ont pas réagi avec une préparation virale de HAV ; des sérums de patients convalescents d'hépatite A ont donné des résultats négatifs dans le test de détection d'anticorps anti-virus NANB épidémique.

30 Le virus NANB épidémique est également distinct du HBV et par voie de conséquence du HDV :

1) La maladie a évolué chez certains patients présentant des anticorps anti-HBsAg et est également apparue chez un patient européen vacciné présentant une forte immunité anti-HBV ;

2) Il n'a généralement pas été détecté de HBsAg et HBcAg ; s'il préexiste des marqueurs de HBV à l'hépatite NANB (chez certains patients ivoliens), il n'apparaît pas d'IgM anti-HBc ;

35 3) Des IgM de singes infectés par du virus NANB épidémique et utilisées pour la détection d'antigène viral, ne réagissent ni avec le HBV ou avec des préparations purifiées de HBsAg, ni avec des sérums de patients répliquant activement le HBV ; des anticorps anti-HBs n'interfèrent pas dans le test de détection d'antigène anti-virus NANB épidémique.

40 Le nouveau virus purifié caractérisé comme décrit dans ce qui précède semble pouvoir être isolé de sources largement réparties. En plus des cas décrits plus haut, l'antigène associé au virus a également été trouvé chez un patient sénégalais et des anticorps ont été trouvés dans le sérum d'un patient convalescent d'une épidémie ayant sévi en Algérie. L'agent NANB épidémique est considéré comme étant un virus véhiculé par l'eau. Néanmoins son rôle dans l'hépatite sporadique, en particulier dans un pays bénéficiant de bonnes conditions d'hygiène, n'exclut pas d'autres voies de transmission, et notamment la voie sanguine.

45 Au demeurant, l'implication du virus NANB épidémique dans des cas d'hépatite NANB sporadique ou post-transfusionnelle, devrait entraîner une reconsidération du qualificatif "épidémique".

Il résulte en effet des travaux de l'Inventeur que le virus identifié conformément à la présente invention, appelé virus de l'hépatite NANB épidémique, sporadique et transfusionnelle (en abrégé : "H-SET") est également responsable de l'apparition d'hépatite de type non A non B chez des malades transfusés.

50 Une étude comparative comprenant des malades polytransfusés sans hépatite infectieuse et des malades atteints d'hépatite A ou B a montré l'absence d'antigène associé au virus dans leurs selles et l'absence de virus cultivables dans les conditions dans lesquelles le virus "H-SET" se multiplie. La souche "H-SET" I-617 isolée des selles d'un malade souffrant d'hépatite NANB transfusionnelle, a pu être cultivée sur cellules PLC/PRP5 dans les conditions décrites plus haut. Les lésions correspondant notamment à de nombreuses formations syncytiales apparaissent à J6-J7 précédant le décollement des cellules infectées. Un procédé identique de culture est susceptible d'être utilisé pour un isolement du virus à partir d'un prélèvement sanguin. Les cultures infectées peuvent être utilisées comme source d'antigène non purifié en

vue de la caractérisation à leur surface des molécules d'anticorps provenant d'un sujet ayant contracté l'infection (le complexe virus-anticorps étant révélé à l'aide d'anti-immunoglobulines humaines marquées).

La souche Clamart s'est avérée infectante pour deux singes rhésus (inoculation par ingestion (per os) avec 0,5 ml d'un extrait de selle à 10 %) avec apparition de l'antigène dans les selles entre les 20<sup>e</sup> et 24<sup>e</sup> jours après l'inoculation et avec augmentation des transaminases entre le 28<sup>e</sup> et le 32<sup>e</sup> jours (signe caractéristique d'atteinte hépatique).

## Revendications

10

1°) Nouvel agent viral purifié impliqué dans l'hépatite virale NANB, caractérisé en ce qu'il présente un profil de répartition de son activité antigénique qui comporte au moins une bande à une densité de 1,28-1,32 g/cm<sup>3</sup> et/ou au moins une bande à une densité de 1,12-1,19 g/cm<sup>3</sup>.

2°) Nouvel agent viral purifié selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par un agent viral purifié impliqué dans l'hépatite virale épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle.

3°) Agent viral selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est isolé de fèces de patients atteints d'hépatite NANB, par centrifugation et filtration à travers un filtre dont la porosité est de l'ordre de 0,22 µm.

4°) Agent viral selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir d'hépatocytes ou à partir de lignées cellulaires continues d'hépatocytes, inoculés par de l'extrait de fèces d'un malade atteint d'hépatite NANB ou par un extrait de foie d'un singe infecté.

5°) Agent viral selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit agent viral auquel est associé un antigène spécifique, se présente sous la forme de particules virales sphériques de deux types principaux, à savoir des particules de l'ordre de 75 nm de diamètre et des particules de l'ordre de 25 à 30 nm de diamètre, les premières étant majoritairement présentes dans les fractions d'un gradient de chlorure de césium de densité variant entre 1,1 et 1,6 g/ml, dont la densité est comprise entre 1,28 et 1,32 g/cm<sup>3</sup> et les fractions à 40-41,5% d'un gradient de saccharose de concentration variant de 10 à 60% poids/volume et les secondes étant majoritairement présentes dans les fractions du gradient de CsCl de densité comprise entre 1,12 et 1,19 g/cm<sup>3</sup> et les fractions à 26-28% dudit gradient de saccharose.

6°) Antigène associé à l'agent viral selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il est obtenu par traitement d'un agent viral isolé de fèces de patients, cultivé sur des hépatocytes infectés, par des agents de dissociation physique ou chimiques.

7°) Antigène selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il est obtenu par traitement aux ultra-sons d'un agent viral isolé de lignées cellulaires continues d'hépatocytes infectés.

8°) Antigène selon la revendication 5 ou la revendication 7, caractérisé en ce que son profil de répartition dans un gradient de CsCl se présente sous la forme d'une bande à une densité de 1,12-1,19 g/cm<sup>3</sup> et/ou d'une bande de densité 1,28-1,32, et en ce que l'antigène est présent après après ultracentrifugation des fractions de CsCl dans un gradient de saccharose, dans la fraction à 26-28% du gradient de saccharose pour la première bande et dans la fraction à 40-41,5% du gradient de saccharose pour la seconde bande.

9°) Procédé d'isolement d'un agent viral impliqué dans l'hépatite virale NANB, caractérisé en ce que des fèces de patients atteints d'hépatite NANB sont soumises à un traitement de centrifugation, suivi d'un traitement de filtration à travers un élément filtrant dont la porosité est de l'ordre de 0,22 µm, pour extraire ledit agent viral des fèces.

10°) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le traitement de centrifugation est avantageusement constitué par une opération de centrifugation à 5000 - 8000 g.

11°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 et 10, caractérisé en ce que préalablement aux opérations de centrifugation et de filtration susdites, l'extrait de fèces est soumis à un traitement de dissociation physique, notamment par ultra-sons ou à un traitement de dissociation chimique.

12°) Procédé d'obtention d'un agent viral impliqué dans l'hépatite virale NANB, caractérisé en ce que des hépatocytes ou des lignées cellulaires continues d'hépatocytes, sont inoculés par un extrait de fèces d'un patient atteint d'hépatite NANB ou par un extrait de foie d'un singe (de préférence Saimiri) inoculé par un extrait de fèces de patients souffrant d'hépatite NANB, et cultivés jusqu'à confluence de la culture, à partir de laquelle est réalisée une sous-culture, qui est centrifugée après plusieurs passages, pour recueillir l'agent viral recherché.

13°) Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il est mis en oeuvre pour l'obtention d'un agent viral impliqué dans l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle.



14°) Procédé selon la revendication 12 ou la revendication 13, caractérisé en ce que le culot de centrifugation est repris par un tampon approprié pour être soumis à un traitement de dissociation physique ou chimique qui libère dans le surnageant, de l'Ag NANB.

15°) Procédé de détection d'antigène NANB présent dans les fèces de patients atteints d'hépatite virale NANB, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un anticorps anti-NANB constitué par des immunoglobulines isolées du sérum de patients convalescents ou de singes préalablement infectés par le virus de l'hépatite NANB, qui sont incubées avec des extraits de fèces de mammifères présumés atteints d'hépatite virale NANB, pour former un immunocomplexe antigène-anticorps qui est révélé à l'aide d'un test de détection approprié de la présence de l'antigène NANB dans lesdites fèces, tel que le RIA ou l'ELISA, notamment, pour la réalisation d'un test de détection de la présence de l'antigène NANB.

16°) Procédé de détection selon la revendication 15, caractérisé en ce que des extraits de fèces de patients présumés infectés par le virus NANB, obtenus par centrifugation et filtration des fèces de ces patients, sont incubés avec des immunoglobulines provenant d'un mammifère artificiellement infecté par le virus d'hépatite NANB, pour former un immunocomplexe antigène-anticorps qui est révélé par des tests de détection appropriés tels que le RIA ou l'ELISA, notamment.

17°) Procédé de détection selon la revendication 16, caractérisé en ce que des extraits de fèces de mammifères présumés infectés par le virus NANB, obtenus par centrifugation et filtration des fèces de ces mammifères, sont incubés avec un anticorps anti-NANB constitué par des fractions d'IgM isolées de sérums de singes infectés artificiellement par des extraits de fèces de patients humains connus pour être atteints d'hépatite NANB, fixées sur un support solide, puis avec une fraction d'IgG immune anti-virus NANB d'un mammifère de la même espèce ou d'une espèce voisine, marquée avec un marqueur fluorescent, radioactif ou enzymatique.

18°) Procédé de détection selon la revendication 17, caractérisé en ce que ladite fraction d'IgG immune est marquée à la  $\beta$ -galactosidase ou à la peroxydase, la réaction étant développée à l'aide d'un substrat révélateur approprié tel que l'orthonitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside ou l'orthophénylènediamine en tampon acide.

19°) Procédé de détection selon l'une quelconque des revendications 15 à 18, caractérisé en ce qu'il est appliqué à la détection des anticorps dans le sang de malades ou dans des produits dérivés du sang.

20°) Procédé de détection selon la revendication 19, caractérisé en ce que la détection desdits anticorps a lieu par mise en contact de sérum de malade ou d'un patient convalescent avec la préparation virale purifiée selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou avec une fraction de cette dernière, après centrifugation et isolement de la bande correspondant à une densité de 1,29-1,32, de préférence préalablement fixée sur les parois d'une microplaque, et révélation du complexe Ag/Ac par une préparation d'anti-immunoglobulines humaines marquées par un marqueur approprié.

21°) Procédé de détection selon la revendication 19, caractérisé en ce que la détection desdits anticorps a lieu par caractérisation d'une activité anticorps dans les IgM d'un patient permettant un diagnostic très précoce de la maladie, en captant les IgM d'un sérum de malade, en les faisant réagir avec la préparation virale purifiée selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou avec une fraction de cette dernière, et en caractérisant l'Ag fixé sur l'IgM du malade à l'aide d'immunoglobulines anti-immunoglobulines humaines ou de fragments de celles-ci, marqués par un marqueur approprié.

22°) Souche d'un agent viral purifié, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, isolé des fèces d'un malade atteint d'hépatite virale NANB sporadique, dite "Souche Clamart", déposée le 30 Octobre 1986 sous le n° I-617 auprès de la COLLECTION NATIONALE DE CULTURE DE MICROORGANISMES.

23°) Souche d'un agent viral purifié, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, isolé des fèces d'un malade atteint d'hépatite virale NANB épidémique, dite "Souche ivoirienne", déposée le 30 Octobre 1986 sous le n° I-616 auprès de la COLLECTION NATIONALE DE CULTURE DE MICROORGANISMES.

24°) Souche d'un agent viral purifié, dite "Souche ivoirienne", selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une culture du virus de l'hépatite NANB provenant des fèces d'un malade atteint d'hépatite virale NANB épidémique, sur des cellules hépatocytes.

25°) Souche d'agent viral selon la revendication 24, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une culture du virus de l'hépatite non A non B provenant des fèces d'un malade atteint d'hépatite virale NANB épidémique, sur une lignée cellulaire continue d'hépatocytes, en particulier sur la lignée continue d'hépatocytes PLC/PRF 5 connue sous le nom de "lignée d'Alexander".

26°) Réactif immunologique pour la détection de l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, par le procédé de détection selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il est constitué par des immunoglobulines isolées de sérum de convalescents humains ou de sérum d'animaux préalablement artificiellement infectés par le virus de l'hépatite NANB.

27°) Réactif immunologique selon la revendication 26, caractérisé en ce qu'il est constitué par un anticorps formé d'immunoglobulines préparées à partir de sérums d'animaux artificiellement infectés par ingestion d'extraits de fèces de patients atteints d'hépatite NANB épidémique.

28°) Réactif immunologique selon la revendication 26, caractérisé en ce qu'il est constitué par un anticorps anti-NANB préparé à partir de sérums d'animaux immunisés par le virus NANB ou ses fractions purifiées.

29°) Réactif immunologique selon la revendication 26, 27 ou 28, caractérisé en ce que l'anticorps anti-NANB est fixé sur un support solide.

30°) Réactif immunologique selon la revendication 29, caractérisé en ce que le support solide revêtu d'anticorps anti-NANB est en outre revêtu de protéines.

31°) Procédé d'isolement d'anticorps anti-NANB de sérums d'animaux artificiellement infectés par ingestion d'extraits de fèces de patients atteints d'hépatite NANB épidémique, caractérisé en ce que lesdits sérums sont chromatographiés sur une colonne de dextrane dans du tampon Tris-NaCl 0,1M, pH 8 pour isoler les IgM anti-NANB.

32°) Procédé selon la revendication 31, caractérisé en ce que les sérums d'animaux artificiellement infectés sont des sérums de singes, collectés à partir du 27<sup>e</sup> jour après l'infection par des extraits de fèces.

33°) Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que les sérums isolés conformément à la revendication 31 sont fixés sur des supports solides, notamment sur des plaques en PVC, par contact entre les IgM à des concentrations de l'ordre de 10 à 50 µg de protéines par ml de PBS, et lesdits supports pendant 18 à 24 heures à + 4°C environ.

34°) Procédé selon la revendication 33, caractérisé en ce que lesdits supports solides, revêtus d'anticorps anti-NANB sont ensuite revêtus d'une couche de PBS contenant 0,1 % environ de BSA et 0,1 % environ de Tween 20.

35°) Procédé de détection d'anticorps dans le sang de patients ou dans des produits dérivés de sang, caractérisé (a) en ce que l'on met en contact un échantillon de sang ou de produit dérivé de sang, avec un réactif constitué par un agent viral selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, et (b) en ce que l'on identifie la présence d'anticorps de l'hépatite NANB virale dans ledit échantillon de sang ou de produit du sang.

36°) Procédé de diagnostic de l'hépatite virale NANB sporadique, épidémique ou post-transfusionnelle dans des extraits de fèces, caractérisé en ce que l'on incube les plaques revêtues d'anticorps IgM selon la revendication 28 ou la revendication 29, (a) tout d'abord avec des extraits de fèces pendant 1 heure environ à 37°C environ, puis (b) avec des fractions d'IgM ou d'IgG purifiées à partir de sérums de patients convalescents d'hépatite NANB épidémique et marquées par une enzyme, en présence d'un substrat révélateur convenable.

37°) Procédé de diagnostic selon la revendication 36, caractérisé en ce que les fractions d'IgG sont marquées par la bêta-galactosidase et le substrat révélateur convenable est de préférence constitué par l'orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside.

38°) Procédé de diagnostic selon la revendication 36, caractérisé en ce que les fractions d'IgG marquées par une enzyme, sont obtenues à partir de sérums de patients convalescents d'hépatite NANB épidémique.

39°) Procédé de préparation des IgG mises en oeuvre selon la revendication 36, caractérisé en ce que les fractions d'IgG sont isolées par purification, de sérums de patients convalescents d'hépatite NANB épidémique, par chromatographie sur une colonne de DEAE-Trisacryl, puis elles sont marquées par une enzyme convenable, de préférence la bêta-galactosidase.

40°) Kit, ou ensemble, prêt l'emploi pour le diagnostic de l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, caractérisé en ce qu'il comprend, outre les tampons, solvants et réactifs nécessaires à la mise en oeuvre du procédé de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 15 à 19 et 36 à 38, au moins un réactif de diagnostic constitué par des IgM anti-NANB fixées sur un support solide, au moins un réactif constitué par des IgG marquées par une enzyme conformément à la revendication 37, et au moins un substrat convenable de révélation de la réaction enzymatique.

41°) Kit de diagnostic de l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, caractérisé en ce qu'il comprend un extrait marqué de l'agent viral selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, des anti-immunoglobulines humaines, des tampons convenables et des réactifs de visualisation du marquage de l'agent viral.

42°) Agent thérapeutique pour le traitement de l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement un anticorps purifié dirigé contre l'agent viral selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

43°) Agent thérapeutique selon la revendication 42, caractérisé en ce qu'il est essentiellement constitué par les IgM selon l'une quelconque des revendications 26 à 30.

44°) Agent thérapeutique selon la revendication 42, caractérisé en ce qu'il est essentiellement constitué par des anticorps monoclonaux produits par un hybridome résultant de la fusion de cellules de myélome et de cellules spléniques de souris auxquelles ont été inoculées des agents viraux de l'hépatite NANB selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

45°) Souche d'un agent viral purifié isolé des fèces d'un malade atteint d'hépatite virale NANB post-transfusionnelle, dite "souche H-SET" déposée le 5 Février 1987 sous le N° 87.02.05.02 auprès de la Collection ECACC (Grande-Bretagne).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

FIG.1

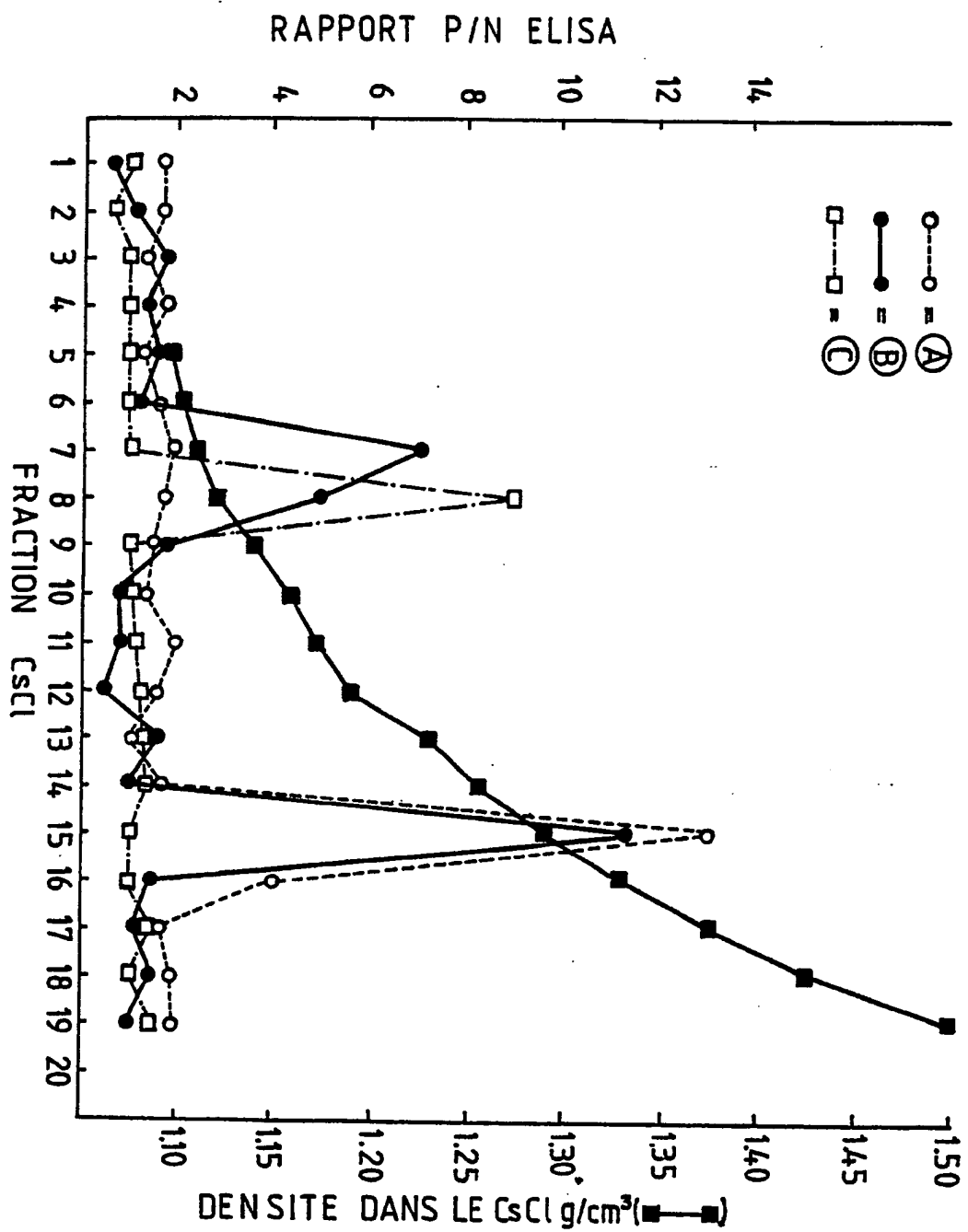
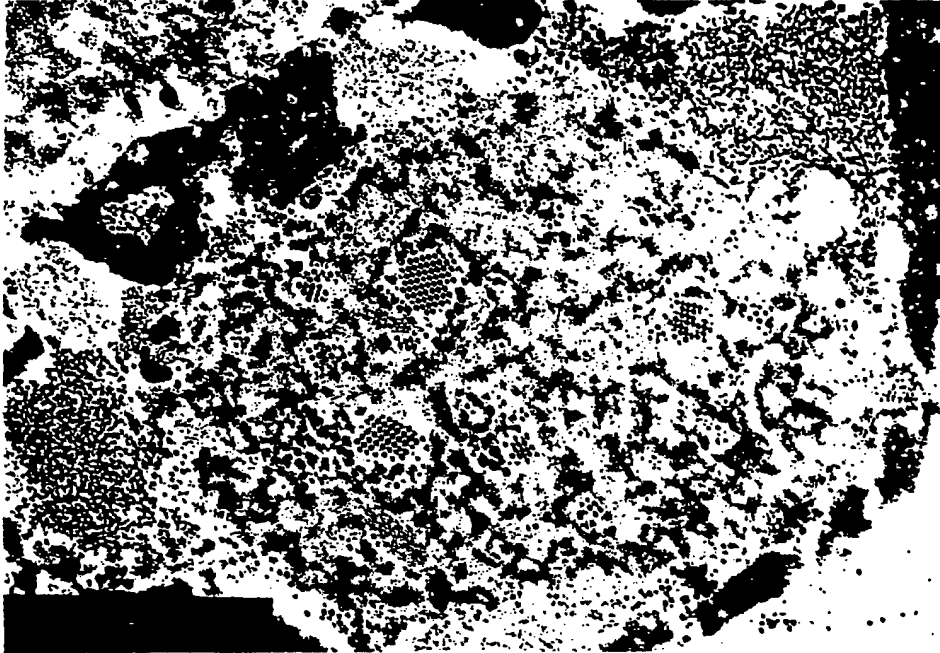
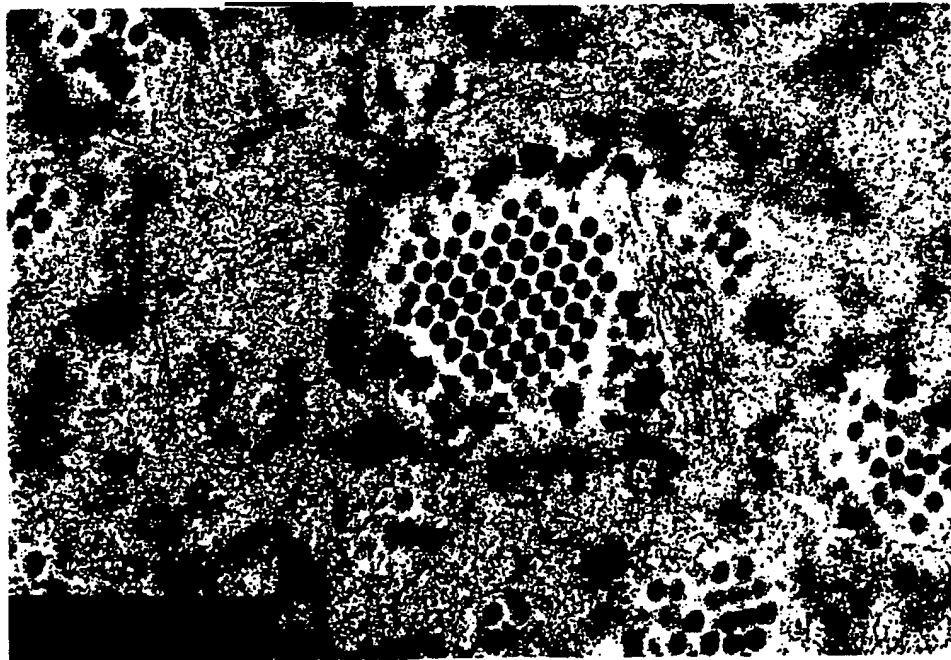


FIG. 2



FIG. 3FIG. 4



Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 87 40 2519

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
Y,D P	EP-A-0 242 300 (INSTITUT PASTEUR) * Page 3, lignes 8-44 *	1-45	A 61 K 39/29 G 01 N 33/576
Y	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 82, no. 6, 1986, page AB-442, résumé no. 53850, Biological Abstracts Inc., Philadelphia, US; J.L. SARTHOU et al.: "Characterization of an antigen-antibody system associated with epidemic non-A, non-B hepatitis in West Africa and experimental transmission of an infectious agent to primates", & ANN INST PASTEUR VIROL 137(2): 225-232, 1986 * Résumé *	1-45	
Y,P	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 83, no. 12, 1987, page AB-576, résumé no. 119271, Biological Abstracts Inc., Philadelphia US; J. PILLOT et al.: "Immunological characterization of a viral agent involved in epidemic and sporadic non-A, non-B hepatitis", & ANN INST PASTEUR VIROL 138(1): 145-158, 1987 * Résumé *	1-45	
Y	WO-A-8 202 774 (BAXTER TRAVENOL LABORATORIES INC.) * En entier *	1-45	
Y	WO-A-8 002 598 (THE UNITED STATES OF AMERICA) * En entier *	1-45	
Y	EP-A-0 061 974 (TREPO CHRISTIAN) * En entier *	1-45	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lien de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 23-02-1988	Examineur REMPP G.L.E.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
A	EP-A-0 093 438 (THE BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND MECHANICAL COLLEGE) ----		
A	EP-A-0 068 465 (EISAI CO. LTD) ----		
A	EP-A-0 066 296 (EISAI CO. LTD) ----		
A	WO-A-8 203 330 (TREPO CHRISTIAN) -----		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 23-02-1988	Examineur REMP G. L. E.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant			





Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



⑪ Numéro de publication: **0 277 437 B1**

⑫ **FASCICULE DE BREVET EUROPEEN**

④⑨ Date de publication de fascicule du brevet: 03.03.93 ⑤① Int. Cl.<sup>5</sup>: **A61K 39/29, G01N 33/576**

②① Numéro de dépôt: **87402519.0**

②② Date de dépôt: **06.11.87**

⑤④ **Agent viral de l'hépatite NANB, antigène et réactif immunologique.**

③① Priorité: 07.11.86 FR 8615625  
11.02.87 FR 8701738

④③ Date de publication de la demande:  
10.08.88 Bulletin 88/32

④⑤ Mention de la délivrance du brevet:  
03.03.93 Bulletin 93/09

⑥④ Etats contractants désignés:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑤⑥ Documents cités:  
EP-A- 0 061 974 EP-A- 0 066 296  
EP-A- 0 068 465 EP-A- 0 093 438  
EP-A- 0 242 300 WO-A-80/02598  
WO-A-82/02774 WO-A-82/03330

BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 82, no. 6,  
1986, page AB-442, résumé no. 53850, Biolo-  
gical Abstracts Inc., Philadelphia, PA, US;  
J.L.SARTHOU et al.: "Characterization of an  
antigen-antibody system associated with  
epidemic non-A, non-B hepatitis in West Afri-  
ca and experimental transmlsion of an In-  
fectious agent to primates"

BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 83, no. 12,  
1987, page AB-576, résumé no. 119271, Biolo-

gical Abstracts Inc., Philadelphia, PA, US;  
J.PILLOT et al.: "Immunological characteriza-  
tion of a viral agnet involved in epidemic  
and sporadic non-A, non-B hepatitis"

⑦③ Titulaire: **INSTITUT PASTEUR**  
25-28, rue du Docteur Roux  
F-75724 Paris Cédex 15(FR)

⑦② Inventeur: **Pillot, Jacques**  
14, Chemin de Moulon  
F-91190 Gif-Sur-Yvette(FR)

⑦④ Mandataire: **Orès, Bernard et al**  
Cabinet ORES 6, Avenue de Messine  
F-75008 Paris (FR)

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la date de publication de la mention de la délivrance du brevet européen, toute personne peut faire opposition au brevet européen délivré, auprès de l'Office européen des brevets. L'opposition doit être formée par écrit et motivée. Elle n'est réputée formée qu'après paiement de la taxe d'opposition (art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

## Description

La présente invention est relative à l'isolement et à la caractérisation d'un agent viral impliqué dans l'hépatite non-A non-B tant épidémique que sporadique ou que post-transfusionnelle.

5 L'hépatite virale peut être causée par le virus de l'hépatite A (HAV), par le virus de l'hépatite B (HBV) et par un nombre inconnu de virus d'hépatite non-A non-B (NANB) non encore identifiés. Actuellement dans les pays développés dans lesquels la prophylaxie de l'HBV est efficace, les NANB sont la cause la plus importante d'hépatite infectieuse conduisant à l'hospitalisation. Cette maladie est considérée comme impliquant au moins trois virus : deux sont transmis par le sang contaminé et les produits de sang  
10 contaminé; pour le troisième qui est à l'origine de l'hépatite NANB épidémique, l'Inventeur a pu établir qu'il est également responsable de 50 à 60% des cas d'hépatites nécessitant une hospitalisation, rapportés dans les pays occidentaux et son mode de transmission est inconnu. Dans les pays en voie de développement, le NANB semble également associé à des épidémies à grande échelle liées à un mode de transmission fécal-oral véhiculé par l'eau. Actuellement cinq cas d'épidémies de ce type ont été rapportés depuis 1980 :  
15 en Inde, en Sibérie, au Népal, en Algérie et récemment en Côte d'Ivoire. Dans tous ces cas, un taux de mortalité élevé a été observé parmi les femmes enceintes.

De nombreuses recherches ont été effectuées pour isoler un agent causal de l'hépatite NANB et obtenir des préparations antigéniques permettant son diagnostic : on citera, par exemple la Demande de Brevet Européen 68 485 au nom de EISAI CO LTD, la Demande PCT 820 330 et la Demande Européenne 61 974  
20 au nom de C. TREPO, la Demande PCT 82 02774 au nom de BAXTER TRAVENOL LABORATORIES.

Nos connaissances actuelles concernant les virus qui sont à l'origine de l'hépatite NANB sont d'une imprécision décourageante et sont limitées à des données cliniques et épidémiologiques. Des agents filtrables ont nettement été isolés par inoculation de sang ou de produits sanguins provenant de sujets souffrant d'hépatite NANB post-transfusionnelle à des chimpanzés et des produits sanguins infectieux sont  
25 disponibles. En ce qui concerne l'hépatite NANB épidémique, très peu d'infections expérimentales ont été réalisées : l'infection s'est avérée transmissible aux ouistitis (*Saguinus mystax*), aux singes macaques (*Macacus cynomolgus*) et à un volontaire humain et récemment à des singes verts africains (*Cercopithecus aethiops* et *Erythrocebus patas*), mais aucune préparation infectieuse définie n'a été proposée.

En ce qui concerne l'hépatite post-transfusionnelle, en dépit de la pléthore de rapports sur des systèmes antigène-anticorps NANB, des modifications ultrastructurales et des particules analogues à des virus, tous potentiellement prometteurs, aucun agent causal ni aucun système ou virus qui remplisse les critères sérologiques acceptés pour une association causale spécifique, n'a été identifié antérieurement aux travaux qui ont abouti à la présente invention. En ce qui concerne l'hépatite épidémique, des particules analogues à des virus, de forme sphérique et de 27 nm de diamètre ont été visualisées dans de très rares  
35 fèces et la caractérisation immunologique a été médiocrement réalisée par agglutination au microscope électronique. La réplication virale n'a jamais été obtenue dans des cultures cellulaires pour quelque virus NANB que ce soit.

SARTHOU et al. [Ann. inst. Virol. 137 (2) 225-252 (1986)] décrivent l'infection expérimentale de singes par des extraits fécaux de patients atteints d'hépatite NANB ; les singes infectés produisent un anticorps de  
40 classe IgM, qui reconnaît un antigène spécifique dans les selles de patients atteints d'hépatite NANB.

La Demande de Brevet français n° 86 05437, au nom de l'INSTITUT PASTEUR, et qui mentionne Monsieur PILLOT comme Inventeur, a pour objet un réactif propre à permettre la détection d'hépatites virales NANB épidémiques et un procédé de diagnostic mettant en oeuvre ce réactif; le réactif conforme à cette Demande de Brevet est constitué par des IgM anti-NANB isolées de sérums de singes infectés  
45 artificiellement par des extraits de fèces de patients connus pour être atteints d'hépatite NANB épidémique, lesquelles IgM anti-NANB sont avantageusement fixées sur des supports solides tels que, notamment, des plaques de PVC.

La poursuite de ses recherches à partir de l'invention objet de la Demande de Brevet précitée a permis à l'Inventeur d'atteindre les buts suivants :

- 50 1°) Il a infecté des singes dont il a utilisé les anticorps (Ac), ainsi que les Ac de convalescents humains, pour développer un test ELISA pour la détection spécifique d'antigènes (Ag) associés au virus et la détection des Ac anti-viraux;
- 2°) L'Inventeur a réussi à répliquer le virus dans une lignée continue de cellules hépatocytaires avec une bonne production de matériel antigénique;
- 55 3°) Il est parvenu à visualiser des particules virales dans des préparations purifiées d'échantillons de fèces et dans des lignées d'hépatocytes infectées;
- 4°) Il a pu établir l'implication du même agent causal dans l'hépatite virale NANB aussi bien épidémique que sporadique.

5°) En considérant le rôle de l'agent NANB épidémique dans l'hépatite sporadique, l'Inventeur a été en mesure de vérifier que ledit agent peut être non seulement véhiculé par l'eau, mais être également transmis par d'autres voies que l'eau et notamment par la voie sanguine transfusionnelle.

La présente invention s'est donné pour but l'identification et la caractérisation d'un nouvel agent viral, ainsi que d'un antigène (Ag) NANB associé à ce nouvel agent viral et une méthode de diagnostic d'hépatite NANB aussi bien épidémique que sporadique et que post-transfusionnelle, par détection de l'Ag associé au virus de NANB, en utilisant les anticorps (Ac) qui font l'objet de la Demande de Brevet INSTITUT PASTEUR précitée ou par recherche des Ac du malade, en utilisant le virus ou ses fractions adsorbé sur un support adéquat.

La présente invention a également pour but de pourvoir à des réactifs de diagnostic immunologiques utilisables dans la méthode de diagnostic de l'hépatite NANB conforme à la présente invention, ainsi qu'à un kit prêt à l'emploi pour la réalisation de ladite méthode de diagnostic.

La présente invention a pour objet un agent viral purifié associé à l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique et post-transfusionnelle, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu à partir de fèces de patients atteints d'hépatite NANB et qu'il se présente sous la forme de particules virales sphériques de deux types principaux, associées à un même antigène viral :

- a) des particules sphériques d'environ 75 nm de diamètre, dont la densité sur un gradient de CsCl est comprise entre 1,28 et 1,32 g/cm<sup>3</sup>, et qui sédimentent dans les fractions d'un gradient de saccharose contenant entre 40 et 41,5% (p/v) de saccharose,
- b) des particules sphériques de 25 à 30 nm de diamètre, dont la densité sur un gradient de CsCl est comprise entre 1,12 et 1,19 g/cm<sup>3</sup>, et qui sédimentent dans les fractions d'un gradient de saccharose contenant entre 26 et 28% (p/v) de saccharose.

La présente invention a, de plus, pour objet un procédé d'isolement d'un agent viral impliqué dans l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique et post transfusionnelle, qui est caractérisé en ce que l'on procède à la centrifugation, sur un gradient de CsCl ou sur un gradient de saccharose, d'un extrait biologique contenant ledit agent viral, et en ce qu'on recueille ledit agent dans les fractions du gradient de CsCl dont la densité est comprise entre 1,29 et 1,32 g/cm<sup>3</sup> dans les fractions du gradient de saccharose contenant entre 40 et 41,5% (p/v) de saccharose, sous forme de particules de 75 nm de diamètre environ, et/ou dans les fractions du gradient de CsCl dont la densité est comprise entre 1,12 et 1,19 g/cm<sup>3</sup> ou du gradient de saccharose contenant entre 26 et 28% (p/v) de saccharose, sous forme de particules de 25 à 30 nm de diamètre.

Selon un mode de mise en oeuvre du procédé d'isolement de l'agent viral susdit, le traitement de centrifugation est avantageusement constitué par une opération de centrifugation à 5000 - 8000 g environ pendant 10 minutes environ.

Selon un autre mode de mise en oeuvre du procédé d'isolement de l'agent viral susdit, préalablement aux opérations de centrifugation et de filtration susdites, l'extrait de fèces est soumis à un traitement par ultra-sons ou à un traitement de dissociation chimique.

La présente invention a également pour objet un autre procédé d'obtention de l'agent viral susdit, qui est caractérisé en ce que des hépatocytes ou des lignées cellulaires continues d'hépatocytes sont inoculés par un extrait de fèces d'un patient atteint d'hépatite NANB ou par un extrait de foie d'un singe (de préférence Saimiri) inoculé par un extrait de fèces de patients souffrant d'hépatite NANB, et cultivés jusqu'à confluence de la culture, à partir de laquelle est réalisée une sous-culture, qui est centrifugée après plusieurs passages, pour recueillir l'agent viral recherché.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux de ce procédé, le culot de centrifugation est repris par un tampon approprié pour être soumis à un traitement par ultrasons qui libère dans le surnatant, l'Ag NANB.

Des souches de l'agent viral conforme à l'invention, isolées comme décrit dans ce qui précède et ci-après, et caractérisées comme indiqué plus loin, ont été déposées auprès de la COLLECTION NATIONALE DE CULTURE DE MICROORGANISMES tenue par l'INSTITUT PASTEUR, en date du 30 Octobre 1986, à savoir :

- une souche d'agent viral isolé de fèces d'un malade atteint d'hépatite NANB sporadique, dite "Souche Clamart", qui a été affectée du Numéro de dépôt : I-617,
- une souche d'un agent viral isolé de fèces d'un malade atteint d'hépatite NANB épidémique, dite "Souche ivoirienne", qui a été affectée du Numéro de dépôt : I-616.

L'invention a également pour objet un procédé de détection des anticorps présents dans le sang du malade ou du convalescent ou dans des produits utilisés en transfusion sanguine ou dans des fractions dérivées de sang, ayant été en contact avec le virus agent causal de l'hépatite non A non B, tel que défini selon la présente invention, dont les souches I-617 et I-616 et celles présentant une réaction immunologi-

que croisée avec les deux souches de référence, selon ce procédé, le sérum du malade ou du patient convalescent est mis en contact avec la préparation virale purifiée (ou avec une fraction de celle-ci) telle que recueillie dans les conditions mentionnées ci-dessus, après centrifugation et isolement de la bande correspondant à une densité de 1,30.

5 Ladite préparation virale est fixée, par exemple sur les parois d'une microplaque selon les techniques connues.

Le complexe Ag/Ac est révélé par une préparation d'anti-immunoglobulines humaines marquées par un marqueur adéquat, par exemple une enzyme.

10 Un système analogue peut être utilisé pour caractériser une activité anticorps dans les IgM d'un patient en vue d'un diagnostic sérologique très précoce de la maladie, en utilisant des anti-IgM humaines, ou mieux en captant les IgM d'un sérum en les faisant réagir avec le virus ou ses fractions et en caractérisant l'Ag fixé sur l'IgM du malade.

Le procédé de diagnostic in vitro de la présence du virus de l'hépatite NANB conforme à la présente invention consiste donc à mettre en contact un sérum ou un autre milieu biologique d'un patient dont on 15 cherche à établir le diagnostic, avec au moins une des protéines ou des glycoprotéines du virus NANB ou avec un lysat viral ou avec un extrait viral, puis à détecter la réaction immunologique par la méthode ELISA ou par une autre méthode immunoenzymatique ou une méthode par immunofluorescence, qui peut mesurer directement ou indirectement l'immunofluorescence ou la réaction immunoenzymatique.

C'est la raison pour laquelle la présente invention englobe également les extraits viraux marqués, qu'ils 20 soient marqués par une enzyme, par fluorescence ou qu'ils soient marqués par un radioisotope.

Les méthodes d'immunodétection comprennent, comme on le sait :

- le dépôt de quantités d'extrait spécifique ou des protéines virales conformes à l'invention, dans ou sur un support tel que les puits d'une microplaque de titration ;
- l'introduction de dilutions croissantes du sérum à diagnostiquer sur ledit support, tel que lesdits puits ;
- 25 - l'incubation du support tel que la microplaque susdite ;
- le lavage soigneux du support tel que la microplaque susdite à l'aide d'un tampon convenable ;
- l'introduction d'anticorps anti-immunoglobuline humaine marqués spécifiques dans ou sur le support tel que les puits de la microplaque susdite, le marquage étant réalisé par une enzyme choisie parmi celles capables d'hydrolyser un substrat de telle manière que l'absorption de radiations par ce dernier 30 soit modifiée au moins dans une bande spécifique de longueurs d'ondes, et
- la détection, de préférence de manière comparative, par rapport à un témoin, de la quantité de substrat hydrolysé, à la fois par la mesure du produit biologique dangereux et par la présence effective de la maladie.

La présente invention a également pour objet un kit - ou ensemble - prêt à l'emploi pour la réalisation 35 du procédé de diagnostic (recherche de l'anticorps ou du virus NANB) conforme à l'invention, défini plus haut, lequel kit est caractérisé en ce qu'il comprend :

- un extrait ou une fraction purifiée de l'agent viral conforme à l'invention, lequel extrait ou fraction est marqué, par exemple par un radioisotope, une enzyme ou par immunofluorescence ;
- des anti-immunoglobulines humaines ou une protéine A éventuellement fixées sur un support 40 insoluble dans l'eau tel que sphères d'agarose ou de latex, magnétiques ou non ;
- des tampons et, si nécessaire, des substrats pour visualiser les marquages.

La caractérisation de certains des antigènes qui entrent dans la composition de l'agent viral isolé conformément à la présente invention a été réalisée dans un premier temps sur la souche Clamart, en procédant comme décrit ci-après.

45 La souche Clamart a été isolée à partir de selles d'un patient atteint d'hépatite NANB sporadique.

Le surnageant desdites selles a été centrifugé en gradient de chlorure de césium dont la bande contenant l'antigène viral purifié comme défini plus haut a été recueillie et sa densité déterminée comme étant de 1,30.

50 Les épitopes reconnus dans le text de diagnostic défini plus haut, sont portés par ces antigènes, qui peuvent à ce titre, être utilisés dans ledit test.

La recherche d'anticorps à l'aide de cette méthode de détection peut être effectuée dans le sang de malades ou de convalescents, dans les produits utilisés dans les transfusions sanguines et dans les fractions dérivées du sang de personnes ayant été exposées à l'agent causal de l'hépatite NANB tel que défini plus haut, parmi lesquelles les souches I-617 et I-616 et celles présentant une réaction immunologi- 55 que croisée avec ces deux souches de référence, notamment la souche isolée de patients atteints d'hépatite NANB post-transfusionnelle, dont les propriétés immunologiques sont identiques à celles de la souche I-617, et qui est identifiée comme souche virale "H-TEST" déposée le 5 Février 1987 sous le N° 87.02.05.02 auprès de la Collection ECACC (Grande-Bretagne).

Bien que les données cliniques et épidémiologiques aient pu suggérer que la forme épidémique de l'hépatite NANB présentée par des patients atteints d'hépatite NANB épidémique est due à un virus différent de celui qui est à l'origine de l'hépatite NANB post-transfusionnelle transmise par injection parentérale, conformément à la présente invention l'inventeur a pu isoler de patients atteints d'hépatite NANB post-transfusionnelle une nouvelle souche de virus NANB dont les propriétés immunologiques sont pratiquement identiques à celles des souches déposées le 30 Octobre 1986 sous les N° I-616 et I-617 auprès de la CNCM de l'Institut Pasteur. Des tests sérologiques très sensibles de présence de virus HAV et HBV ont permis d'exclure ces deux virus en tant qu'agents étiologiques et d'exclure, de même, d'autre virus hépatotropes tels que le cytomégalovirus, le virus d'Epstein-Barr et le virus de la fièvre jaune.

La présente invention a en outre pour objet un nouvel agent viral purifié impliqué dans les formes sporadique, épidémique et post-transfusionnelle de l'hépatite NANB. Ce virus se distingue des virus HAV et HBV en ce qui concerne l'homologie antigénique de ses protéines en tant que matériel génétique.

Les compositions préparées conformément à la présente invention (antigènes viraux purifiés, protéines recombinantes obtenues par l'expression du virus NANB dans des cellules procaryotes ou eucaryotes ou peptides synthétiques déduits de la séquence du génome) peuvent être utilisées pour le diagnostic de l'hépatite NANB ou pour la vaccination propre à induire la synthèse d'une réponse immune protectrice après administration à l'hôte.

La présente invention englobe toutes les compositions de ce type contenant un antigène présentant des propriétés immunologiques équivalentes à celles du virus NANB Clamart (CNCM I-617) ou Côte d'Ivoire (CNCM I-616). En effet, deux protéines ou antigènes sont considérés comme équivalents dans le cadre de la présente invention lorsqu'ils sont capables d'être reconnus par les mêmes anticorps. Les produits exprimés par des séquences correspondantes du matériel génétique codant des séquences génétiques correspondantes sont, par suite, compris dans le cadre de tels antigènes équivalents.

La présente invention englobe également les sérums pouvant être produits à partir d'animaux par inoculation à ces derniers de virus NANB à l'aide des compositions précitées. En particulier, la présente invention englobe les anticorps polyclonaux spécifiquement dirigés contre chacun des antigènes du virus NANB. Elle englobe également les anticorps monoclonaux susceptibles d'être obtenus par des méthodes appropriées et dirigées plus spécifiquement contre les antigènes du virus NANB.

Conformément à la présente invention, l'utilisation du virus ou de son lysat ou d'une fraction de ce lysat peut être envisagée pour la préparation d'anticorps monoclonaux et le lysat viral ou les fraction de celui-ci ou les protéines purifiées à partir de ce virus, du lysat ou de ses fractions, peuvent être utilisés pour la recherche d'anticorps dans le sérum des patients par mise en oeuvre de tests classiques de type RIPA, ELISA ou Western blot (immunoempreinte).

Ces anticorps polyclonaux et monoclonaux peuvent être utilisés dans un grand nombre d'applications au nombre desquelles on peut citer la neutralisation de l'antigène correspondant ou du virus total. Ils peuvent être utilisés pour détecter des antigènes viraux dans des préparations biologiques ou pour purifier des antigènes correspondants.

La présente invention englobe également tout virus de l'hépatite NANB équivalent présentant les mêmes caractéristiques immunologiques. Les travaux menés par l'inventeur ont montré la relation immunologique entre les matériels antigéniques isolés d'extraits de fèces de malades atteints respectivement d'hépatite NANB épidémique, sporadique et post-transfusionnelle.

C'est ainsi que la souche de type Clamart (déposée sous le N° I-617 auprès de la CNCM et également déposée auprès de la Collection ECACC sous le N° 87.02.05.02) a été isolée à partir des selles d'une malade qui présentait une hépatite aiguë NANB dûment caractérisée comme hépatite NANB transfusionnelle. Les selles contenaient l'antigène conforme à l'invention, également caractérisé, conformément à l'invention, dans les hépatites épidémiques (Côte d'Ivoire) et sporadiques (France).

Un antigène associé au virus de l'hépatite NANB a été caractérisé pendant 15 jours à la phase aiguë de la maladie. D'autres cas similaires ont été observés avec caractérisation du même antigène dans les selles et isolement d'un virus présentant les caractéristiques immunologiques identiques aux virus I-616 et I-617.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples de mise en oeuvre sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Au cours d'une première étape, deux singes *Cercopithecus aethiops* et un singe *Erythrocebus patas* ont été inoculés par voie orale par 2 ml d'un mélange d'un extrait aqueux à 10% de fèces de patients ivoiriens présumés atteints d'hépatite NANB épidémique, collectées au cours des premiers jours ayant suivi

l'apparition des symptômes. Le mélange avait été préalablement centrifugé et filtré à travers des filtres Millipore® de 0,22 µm pour éliminer les bactéries et les parasites. Les échantillons de sérum et les échantillons de fèces de ces singes ont été collectés d'une part avant l'administration de l'extrait de fèces et d'autre part le vingt-septième jour après l'inoculation. Les fonctions hépatiques de ces singes n'ont pas  
 5 été étudiées; ces animaux ne présentaient pas de manifestations cliniques évidentes. Un singe Saimiri a également été inoculé dans les mêmes conditions par 0,5 ml d'un extrait de fèces provenant d'un patient ivoirien différent de ceux utilisés pour les singes verts d'Afrique. Un second singe Saimiri qui avait été inoculé trois mois auparavant par une préparation fécale de virus d'hépatite A et séroconverti à l'aide d'anticorps IgM anti-HAV au jour 29, a été inoculé par voie intraveineuse par 0,5 ml du même échantillon de  
 10 fèces filtré. Les deux singes Saimiri ont été saignés deux fois par semaine pour effectuer des examens biochimiques et sérologiques et leurs fèces ont été examinées quotidiennement. Les deux singes Saimiri sont morts au jour 28, sans avoir présenté de symptômes particuliers. Aucun des singes n'avait présenté de preuve biochimique convaincante d'un dysfonctionnement hépatique et l'examen histologique effectué post-mortem a montré une congestion du foie sans lésion du parenchyme. Les sérums de ces cinq singes  
 15 ont été fractionnés dans du tampon Tris NaCl 0,1M, pH 8, sur du "Sephacryl® S 300" et les fractions contenant des IgM et des IgG ont été collectées. Elles ont été utilisées en tant qu'anticorps récepteurs dans un test immunoenzymatique. L'IgM a été choisie pour sa capacité de capture élevée et pour empêcher les réactions faussement positives dues à un facteur rhumatoïde ou analogue au facteur rhumatoïde, qui a été reconnu comme stimulant l'antigène NANB.

20 En fait, on pourrait également utiliser l'IgG bien que son bruit de fond soit un peu plus élevé que celui de l'IgM et sa spécificité déficiente pour certaines préparations.

Pour révéler la fixation d'antigène de fèces sur l'anticorps en phase solide, des IgG provenant de sérums de convalescents ont été fractionnées par chromatographie sur DEAE-trisacryl, après précipitation par du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Les IgG ont été conjuguées à la  $\beta$ -galactosidase ou à la peroxydase. Des IgG marquées  
 25 ont été utilisées pour la détection de l'antigène : une préparation d'IgG provenant d'un patient ivoirien convalescent d'une hépatite NANB épidémique; une préparation d'IgG prélevée chez un patient algérien guéri, au cours de l'épidémie de Medea en 1981-1982; enfin l'IgG d'un singe Cercopithecus inoculé expérimentalement. Les préparations d'IgG des trois origines ont donné des résultats équivalents. Pour chaque singe, on a utilisé de l'IgM de pré-inoculation en phase solide comme témoin de spécificité d'IgM  
 30 de post-inoculation. De l'IgG humaine marquée non-immune a été utilisée comme témoin de marquage d'Ag. Les fèces de singes inoculés ont été examinées pour établir la présence d'un Ag présumé NANB dans le test ELISA. Une activité antigénique a été détectée dans les fèces des deux singes Saimiri (cf. Tableau 1). L'application d'un traitement par ultra-sons a permis d'augmenter la quantité d'antigène détecté et a augmenté la sensibilité de la méthode. L'Ag est apparu dès le quatrième jour après l'inoculation et a  
 35 persisté jusqu'au treizième jour.

Le Tableau 1 montre l'Ag NANB détecté dans les fèces de singes infectés expérimentalement par des extraits de fèces provenant de patients atteints de NANBH épidémique.

La détection a été réalisée comme suit, en mettant en oeuvre la technique ELISA : des immunoplaques NUNC® ont été revêtues de 100 µl de 50 µg/ml de fraction d'IgM, échantillonnées 27 jours après  
 40 inoculation, dans une solution physiologique de tampon phosphate (PBS) pendant une heure à 37°C et une nuit à 4°C. Après plusieurs lavages, les plaques ont été recouvertes de 200 µl de PBS contenant 1% de sérum-albumine bovine et 0,1% de Tween® 20, pendant trois heures à 37°C. Après lavage, 100 µl des extraits de fèces (1/10 v/v) filtrés sur un élément de porosité 0,22 µm sont incubés sur les IgM du revêtement, à 37°C pendant une heure, puis une nuit à 4°C. Après plusieurs lavages, 100 µl d'IgG de  
 45 singe immun marquée à la peroxydase à 5 mcg/ml dans 1% de BSA + 1% de Tween® 20 dans du tampon Tris sodique, pH 7,6 (TNB) contenant 0,1 % de  $\text{NaN}_3$ , ont été utilisés pour la détection de l'Ag. Au bout d'une heure d'incubation à 37°C et plusieurs lavages, la réaction a été développée à l'aide de 100 µl d'orthophénylène-diamine dans 0,005 M de tampon citrique pH 5,6, avec 1 µl/ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Les résultats obtenus sont exprimés par le rapport entre l'échantillon étudié et la moyenne de cinq échantillons négatifs  
 50 (P/N). Le bruit de fond des échantillons négatifs a été de l'ordre de 0,04-0,06 en densité optique (DO) à 492 nm. Il est plus élevé si le  $\text{NaN}_3$  a été omis, mais, dans ce cas, des quantités de réactifs plus faibles doivent être mises en réaction. Les échantillons dont le rapport P/N 2,1, ont été considérés comme positifs. Les fèces (1/10 poids/poids) qui ont été examinées étaient de deux types : celles ayant subi un traitement aux ultra-sons et celles n'ayant pas subi un tel traitement; le traitement aux ultra-sons appliqué est de trois  
 55 minutes à 4°C, avec une intensité de sortie de 4 avec l'appareil de BRENSON pour des volumes de 2 à 3 ml avant centrifugation et filtration à travers un élément de porosité de 0,22 µm. Les résultats positifs sont soulignés dans le Tableau 1. Les fèces d'un singe Saimiri ayant reçu de l'extrait de fèces d'un patient atteint d'une maladie du foie non-infectieuse ont servi de témoin et ont constamment donné des résultats

négatifs.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

TABLEAU 1

Nombre de jours après inoculation	P/N sans traitement par ultra-sons		P/N avec traitement par ultra-sons	
	Singe N° 1 (inoculation par voie intraveineuse)	Singe N° 2 (inoculation par voie orale)	Singe N° 1	Singe N° 2
0	1,15	1,14	1,18	1,07
4	2,47	1,60	5,10	0,79
7	<u>6,48</u>	3,28	<u>8,78</u>	5,52
9	<u>3,64</u>	<u>2,24</u>	<u>4,72</u>	<u>5,82</u>
11	1,12	1,40	1,95	5,20
13	1,30	1,46	2,40	0,80
15	1,51	1,68	0,93	0,90
19	1,53	1,51	1,20	0,80



Une deuxième étape a consisté à étudier des fèces de patients atteints d'une hépatite NANB aiguë présumée, aussi bien sous sa forme épidémique (patients ivoiriens) que sous sa forme sporadique (patients français). Le diagnostic de l'hépatite NANB a été établi conformément aux critères immunologiques classiques des trois types d'infections par des virus d'hépatite (A,B, delta) : présence ou absence d'IgM et d'IgG anti-HAV pour l'infection par le virus A; HBsAg, anti-HBc et IgM anti-HBc, anti-HBs, pour l'infection par HBV; les Ag delta et anti-delta pour l'infection par HDV, le cas échéant. Pour les patients ivoiriens, les marqueurs de la fièvre jaune ont été recherchés. On a également recherché chez tous ces patients l'infection par le cytomégalovirus par immunocapture d'anticorps IgM et l'infection par le virus d'Epstein-Barr, par détection d'IgM anti-VCA dans les taches immunofluorescentes. L'Ag associé à la NANB a été détecté aussi bien dans les cas épidémiques que dans les cas sporadiques (cf. Tableau 2). Il n'a pas été détecté d'Ag dans 90 extraits témoins de patients européens présentant d'autres troubles gastro-intestinaux. Dans la plupart des cas, ces résultats ont été confirmés plusieurs fois avec différentes IgM ou IgG en phase solide et avec différentes IgG marquées. Les mêmes échantillons positifs ont été étudiés avec l'IgM pré-immune recouvrant une plaque et il n'a pas été détecté d'antigène. Il en résulte que l'Ag détecté paraît étroitement lié au virus NANB.

Le Tableau 2 ci-après illustre la détection d'Ag NANB dans les fèces de patients atteints d'hépatite NANB épidémique (de Côte d'Ivoire) et sporadique (de France). 90 fèces de patients suspectés d'infections gastro-intestinales ont été utilisées comme témoins. Tous les échantillons présumés NANB et 17 des 90 témoins ont été soumis à un traitement par ultra-sons. De l'anticorps (Ac) humain marqué à la peroxydase ou la  $\beta$ -galactosidase, a été utilisé comme traceur d'Ag.

TABLEAU 2

	Echantillons de fèces de Côte d'Ivoire : cas épidémiques	Echantillons de fèces de France : cas sporadiques	Témoins de France
AG NANB positif	17	7	0
AG NANB négatif	44	10	90

Pour vérifier que l'Ag détecté est effectivement étroitement lié au virus NANB, au cours d'une troisième étape, des lignées cellulaires continues d'origine hépatocytiques, PLC/PRF 5 et HEP G2, et des cellules normales humaines fibroblastiques MRC 5, ont été inoculées dans du milieu de DULBECCO contenant 10% de sérum de veau foetal, par un extrait de fèces d'un malade atteint d'hépatite NANB. Après confluence de la culture, une sous-culture a été réalisée après addition d'EDTA-trypsine. Dans certains cas, des substances toxiques présentes dans les fèces provoquent la mort des cellules précocement lors de la première semaine, tandis que d'autres fèces non toxiques pour les lignées cellulaires, induisent la mort des cellules après plusieurs passages. Cet effet léthal spécifique a été observé uniquement avec la lignée cellulaire PLC/PRF 5 mais ne l'a pas été avec la lignée cellulaire HEP G2 et les cellules MRC 5. Après traitement des cellules aux ultra-sons et filtration sur porosité 0,22  $\mu$ m, de l'Ag NANB a été détecté dans le surnageant de PLC/PRF 5 infectées mais pas dans le surnageant des HEP G2 infectées dans les mêmes conditions.

Pour des extraits de foie de singes inoculés, on n'a pas observé de toxicité cellulaire après inoculation et les cellules PLC/PRF 5 ont présenté une positivité antigénique de la même manière que dans le cas d'échantillons de fèces (cf. Tableau 3).

Le Tableau 3 illustre la détection d'Ag NANB dans la lignée cellulaire d'hépatome inoculée par un extrait de fèces d'un patient ivoirien souffrant d'hépatite NANB épidémique et par un extrait de foie d'un singe Saimiri infecté (N° 1).

L'extrait de foie a été préparé dans du PBS (10% poids/poids) et homogénéisé à l'aide de l'"Ultraturax"®. Après centrifugation, le culot a été remis en suspension dans 4 fois son volume de TNB et soumis à un traitement aux ultra-sons en présence de 0,005 mg/ml de chlorure de phénylméthyl-sulfonide (PMSF).

Un extrait de foie d'un singe Saimiri inoculé par un extrait de fèces de patients souffrant d'une maladie de foie non-infectieuse a servi de témoin.

Après trois passages, les cultures cellulaires inoculées ont été centrifugées. Le culot a été repris dans du TNB et après addition de PMSF, les cellules ont été soumises à un traitement aux ultra-sons. Les chiffres indiquent le rapport P/N.

TABLEAU 3

Lignée cellulaire d'hépatome	Cellules inoculées par de l'extrait de fèces de patient ivoirien	Cellules inoculées par de l'extrait de foie de singe Saimiri infecté	Cellules inoculées par de l'extrait de foie de singe Saimiri témoin	Cellules non-inoculées
PLC/PRF 5	8,19 *	4,39	2	1,01
HEP G2	1,62	1,14	2	1,07

\* après dilution à 1/100 P/N : 6,29.

Il semble ressortir des essais préliminaires de marquage par immunofluorescence qu'une cellule sur 50 environ, seulement, soit infectée, dans les conditions expérimentales.

Une quatrième étape a eu pour objet de purifier l'antigène associé au virus, provenant d'échantillons de fèces de différentes origines. Trois profils de répartition d'antigène ont été observés et sont représentés à la figure 1 annexée qui montre que dans des échantillons fraîchement utilisés, l'activité antigénique apparaît sous la forme d'une bande à une densité de 1,29-1,32 g/cm<sup>3</sup>. Certains des échantillons de fèces conservés à + 4° C pendant quelques mois, ou des échantillons frais ayant subi un traitement par ultra-sons, n'ont présenté d'activité antigénique qu'à une densité de 1,12-1,19 g/cm<sup>3</sup>, tandis que d'autres présentaient une activité aux deux densités.

La figure 1 représente la répartition de l'antigène dans le gradient de CsCl après ultracentrifugation isopycnique, obtenue en procédant comme suit :

3 ml d'échantillons de fèces (10 % dans RPMI) ont été fractionnés après filtration à travers un élément filtrant de 0,22 µm de porosité, dans un gradient de CsCl de densité comprise entre 1,1 et 1,6 g/ml. La centrifugation isopycnique (48 heures) à 78000 g a été effectuée dans des tubes de 12 ml (1,2,3,2, 0,5, 0,5 ml de CsCl de densité 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5 et 1,6 respectivement). 0,6 ml de fractions ont été collectés et testés pour déterminer la présence d'antigène NANB après deux dilutions.

Dans la figure 1:

A désigne les fèces fraîches

B et C des fèces conservées ou traitées aux ultra-sons.

Du matériel antigénique à faible densité apparaissant dans ces conditions est supposé résulter d'un effet de décomposition par des enzymes contenues dans les fèces ou par un traitement physique. Les fractions de CsCl à antigénicité positive ont été soumises à une ultracentrifugation dans un gradient de saccharose variant de 10 à 60 % poids/volume et les fractions réactives ont été étudiées à l'ultramicroscopie. L'antigène NANB a été trouvé à 40-41,5 % de saccharose et de façon prédominante à 26-28 % de saccharose. Sept préparations obtenues à partir de 9 échantillons à antigénicité NANB positive, comportaient des particules virales : une provenant d'un singe Saimiri inoculé (le second singe n'a pas été examiné), deux provenant de deux des trois patients atteints d'hépatite NANB épidémique aiguë (Côte d'Ivoire), quatre provenant de quatre des cinq patients atteints d'hépatite NANB sporadique (France). Deux types de particules virales sphériques ont été observées : des particules de grandes dimensions, de l'ordre de 75 nm de diamètre, qui présentent une structure à double membrane, et des particules de dimensions plus petites, homogènes, de 25 à 30 nm de diamètre environ, sans aucune structure interne définie. Une structure tubulaire de 15 nm de diamètre (ou de largeur) et dont la longueur peut atteindre 1 µm, plus ou moins fixée aux particules, a été observée et est représentée à la figure 2 annexée. Certaines images donnent l'impression que des tubules partent de l'enveloppe des particules virales de grandes dimensions. Les particules les plus caractéristiques ont été observées dans des échantillons frais n'ayant pas subi de traitement par ultra-sons. Des particules sphériques de grandes dimensions ont pu être observées pour la plupart dans des fractions de densité comprise entre 1,29 et 1,32 g/cm<sup>3</sup> et dans la fraction de 40-41,5 % de saccharose du gradient de saccharose, tandis qu'on n'a pu observer que des particules de dimensions moindres dans les fractions de CsCl présentant une densité comprise entre 1,12 et 1,19 g/cm<sup>3</sup> et dans la fraction du gradient de saccharose à 26-28 % de saccharose. Il n'a pas encore pu être établi si les particules les plus petites et de densité plus basse représentent une forme de libération du virus de départ. Six échantillons de fèces à antigénicité négative ont également été étudiés simultanément de la même manière pour servir de témoins. On n'a trouvé dans aucune de ces préparations une structure ayant l'aspect de particules.

Une dernière étape a permis de mettre en évidence que la détection d'Ag NANB dans les fèces démontre que le virus NANB épidémique est fréquemment impliqué dans l'hépatite NANB sporadique. De l'Ag NANB associé au virus a été détecté dans sept échantillons de fèces parmi 17 patients examinés

atteints d'hépatite NANB sporadique aiguë (cf. figure 2). Des examens sérologiques ont confirmé ces résultats : parmi huit patients dont on disposait des sérums, sept d'entre eux présentaient un sérum avec l'anticorps anti-NANB.

La figure 2 illustre la caractérisation de particules virales au microscope électronique dans les fèces de singes infectés par NANB et de patients atteints d'hépatite NANB.

Après ultracentrifugation isopycnique comme décrit en relation avec la figure 1, les fractions positives ont été mélangées, puis dialysées contre du TNB, puis elles ont été soumises à une ultracentrifugation zonale dans un gradient de saccharose (10-60 % poids/poids) à 78000 g pendant 5 heures. Les fractions positives ont été mélangées, dialysées, concentrées et examinées au microscope électronique. Une goutte de préparation virale a été étalée sur une grille de 200 mesh revêtue de carbone et après absorption sur papier-filtre, une goutte de 2 % d'acétate d'uranyle dans de l'eau distillée a été ajoutée. Au bout de deux minutes, la grille a été essuyée avec du papier-filtre et étudiée au microscope JEM 100 C x II.

Les figures 3 et 4 annexées représentent des coupes vues au microscope électronique après coloration par l'acétate d'uranyle de cellules PLC/PRF 5 inoculées avec un extrait de selles d'un patient souffrant d'hépatite non A non B chez lequel l'Ag a été détecté dans ses selles selon les techniques décrites plus haut.

Les particules virales sont retrouvées dans le noyau et le cytoplasme sous forme de "réseaux cristallins" ; le diamètre de la particule est très constant : 74 à 75 nm. La figure 3 est une vue à grossissement X16000 et la figure 4 une vue à grossissement 54000.

Comme les épidémies d'hépatite NANB sont habituellement observées dans les pays en voie de développement, il a paru intéressant d'examiner si les mêmes virus jouent, dans ces pays, un rôle dans les cas sporadiques. C'est pourquoi 28 sérums de patients marocains souffrant d'hépatite NANB aiguë sporadique ont été examinés pour déterminer s'ils contiennent des anticorps vis-à-vis du virus NANB épidémique. 68 % des patients se sont avérés présenter des anticorps anti-virus NANB épidémique tandis que les mêmes anticorps n'ont été détectés que dans 10 % de sérums de donneurs de sang, dans le même pays.

Le Tableau 4 ci-après illustre la détection d'anticorps spécifiques vis-à-vis de l'antigène NANB dans des sérums de patients souffrant d'hépatite NANB sporadique. La présence d'anticorps a été démontrée par inhibition de la réaction dans les conditions décrites dans le Tableau 1 ci-dessus. La réaction a été réalisée en incubant 50 µl d'un extrait de référence provenant de fèces de singe infecté, pendant une heure à 37 °C et une nuit à 4 °C, avec 50 µl du sérum à examiner. Toutes les autres étapes de la réaction ont été réalisées de la même manière que pour la détection de l'Ag. Le rapport P/N de cet antigène de référence était de l'ordre de 6-8. 24 sérums humains normaux non dilués ont été testés dans une réaction d'inhibition contre l'Ag de référence comparativement au PBS ; aucun d'entre eux n'a exercé d'action inhibitrice. Ultérieurement, 50 µl d'un mélange de ces sérums ont servi à établir la positivité à 100 % de la réaction. Les échantillons testés ont été considérés comme positifs lorsque l'inhibition était supérieure à 50 %.

\* L'Ag NANB a été détecté dans les fèces de cinq patients souffrant d'hépatite NANB aiguë ; on n'a pas trouvé d'anticorps dans l'une d'entre elles. Chez deux autres patients, la maladie aiguë datait respectivement de 9 et de 3 mois et il n'a plus pu être détecté d'Ag dans les fèces. Le dernier des cinq patients avait présenté dans le passé une hépatite NANB avec de l'anticorps décelable qui a disparu au bout de 3 ans.

**TABLEAU 4**

Source de sérum Pays	Donneurs de sang	Personnel du Labo- ratoire	Patients en hémo- dialyse	Hépatite NANB sporadique
MAROC	8/78	0/12	1/12	19/28
FRANCE	0/26			7/8

Comme le montre le Tableau 4 ci-dessus, l'hémodialyse ou un travail de laboratoire impliquant la manipulation de sang humain ne paraît pas augmenter le risque d'infection par le virus NANB. Le fait que

l'on utilise des Ac préparés à partir de singes infectés par un virus NANB épidémique, pour la détection d'Ag liés à un virus NANB sporadique, montre qu'il s'agit du même virus.

Les différentes étapes de l'étude qui viennent d'être décrites ont permis de caractériser un nouvel agent viral impliqué dans l'hépatite NANB. Cet agent viral semble être responsable aussi bien de la forme épidémique que de la forme sporadique et de la forme post-transfusionnelle de l'hépatite NANB.

Il est différent du virus HAV :

1) Une infection par le virus NANB épidémique a été observée chez un singe et chez des patients présentant une immunité anti-HAV ;

2) Les marqueurs usuels de l'infection aiguë (IgM anti-HAV) n'ont pas été détectés ;

3) Ce virus induit une réponse immune spécifique et les anticorps n'ont pas réagi avec une préparation virale de HAV ; des sérums de patients convalescents d'hépatite A ont donné des résultats négatifs dans le test de détection d'anticorps anti-virus NANB épidémique.

Le virus NANB épidémique est également distinct du HBV et par voie de conséquence du HDV :

1) La maladie a évolué chez certains patients présentant des anticorps anti-HBsAg et est également apparue chez un patient européen vacciné présentant une forte immunité anti-HBV ;

2) Il n'a généralement pas été détecté de HBsAg et HBeAg ; s'il préexiste des marqueurs de HBV à l'hépatite NANB (chez certains patients ivoiriens), il n'apparaît pas d'IgM anti-HBc ;

3) Des IgM de singes infectés par du virus NANB épidémique et utilisées pour la détection d'antigène viral, ne réagissent ni avec le HBV ou avec des préparations purifiées de HBsAg, ni avec des sérums de patients répliquant activement le HBV ; des anticorps anti-HBs n'interfèrent pas dans le test de détection d'antigène anti-virus NANB épidémique.

Le nouveau virus purifié caractérisé comme décrit dans ce qui précède semble pouvoir être isolé de sources largement réparties. En plus des cas décrits plus haut, l'antigène associé au virus a également été trouvé chez un patient sénégalais et des anticorps ont été trouvés dans le sérum d'un patient convalescent d'une épidémie ayant sévi en Algérie. L'agent NANB épidémique est considéré comme étant un virus véhiculé par l'eau. Néanmoins son rôle dans l'hépatite sporadique, en particulier dans un pays bénéficiant de bonnes conditions d'hygiène, n'exclut pas d'autres voies de transmission, et notamment la voie sanguine.

Au demeurant, l'implication du virus NANB épidémique dans des cas d'hépatite NANB sporadique ou post-transfusionnelle, devrait entraîner une reconsidération du qualificatif "épidémique".

Il résulte en effet des travaux de l'Inventeur que le virus identifié conformément à la présente invention, appelé virus de l'hépatite NANB épidémique, sporadique et transfusionnelle (en abrégé : "H-SET") est également responsable de l'apparition d'hépatite de type non A non B chez des malades transfusés.

Une étude comparative comprenant des malades polytransfusés sans hépatite infectieuse et des malades atteints d'hépatite A ou B a montré l'absence d'antigène associé au virus dans leurs selles et l'absence de virus cultivables dans les conditions dans lesquelles le virus "H-SET" se multiplie. La souche "H-SET" I-617 isolée des selles d'un malade souffrant d'hépatite NANB transfusionnelle, a pu être cultivée sur cellules PLC/PRP5 dans les conditions décrites plus haut. Les lésions correspondant notamment à de nombreuses formations syncytiales apparaissent à J6-J7 précédant le décollement des cellules infectées. Un procédé identique de culture est susceptible d'être utilisé pour un isolement du virus à partir d'un prélèvement sanguin. Les cultures infectées peuvent être utilisées comme source d'antigène non purifié en vue de la caractérisation à leur surface des molécules d'anticorps provenant d'un sujet ayant contracté l'infection (le complexe virus-anticorps étant révélé à l'aide d'anti-immunoglobulines humaines marquées).

La souche Clamart s'est avérée infectante pour deux singes rhésus (inoculation par ingestion (per os) avec 0,5 ml d'un extrait de selle à 10 %) avec apparition de l'antigène dans les selles entre les 20<sup>e</sup> et 24<sup>e</sup> jours après l'inoculation et avec augmentation des transaminases entre le 28<sup>e</sup> et le 32<sup>e</sup> jours (signe caractéristique d'atteinte hépatique).

## Revendications

Revendications pour les Etats contractants suivants : AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. Agent viral purifié, associé à l'hépatite virale NANB sporadique, épidémique et post-transfusionnelle, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu à partir de fèces de patients atteints d'hépatite NANB et qu'il se présente sous la forme de particules virales sphériques de deux types principaux, associées à un même antigène viral :

a) des particules sphériques d'environ 75 nm de diamètre, dont la densité sur un gradient de CsCl est comprise entre 1,28 et 1,32 g/cm<sup>3</sup>, et qui sédimentent dans les fractions d'un gradient de saccharose contenant entre 40 et 41,5 % (p/v) de saccharose,

b) des particules sphériques de 25 à 30 nm de diamètre, dont la densité sur un gradient de CsCl est comprise entre 1,12 et 1,19 g/cm<sup>3</sup>, et qui sédimentent dans les fractions d'un gradient de saccharose contenant entre 26 et 28 % (p/v) de saccharose.

- 5 2. Souche d'un agent viral purifié selon la Revendication 1, dite "souche Clamart", déposée le 30 Octobre 1986 sous le numéro I-617, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes.
3. Souche d'un agent viral purifié selon la Revendication 1, dite "souche Ivoirienne", déposée le 30 Octobre 1986 sous le numéro I-616 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes.
- 10 4. Souche d'un agent viral purifié selon la Revendication 1, dite "souche H-SET", déposée le 5 Février 1987 sous le numéro 87.02.05.02 auprès de la Collection ECACC (Grande Bretagne).
- 15 5. Procédé d'isolement d'un agent viral selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'on procède à la centrifugation, sur un gradient de CsCl ou sur un gradient de saccharose, d'un extrait biologique contenant ledit agent viral, et en ce qu'on recueille ledit agent dans les fractions du gradient de CsCl dont la densité est comprise entre 1,29 et 1,32 g/cm<sup>3</sup> ou dans les fractions du gradient de saccharose contenant entre 40 et 41,5% (p/v) de saccharose, sous forme de particules sphériques de 75 nm de diamètre environ, et/ou dans les fractions du gradient de CsCl dont la densité est comprise entre 1,12 et 1,19 g/cm<sup>3</sup>, ou dans les fractions du gradient de saccharose contenant entre 26 et 28% (p/v) de saccharose, sous forme de particules sphériques de 25 à 30 nm de diamètre.
- 20 6. Procédé selon la Revendication 5, caractérisé en ce que l'extrait biologique comprenant l'agent viral est constitué par des fèces de patients atteints d'hépatite NANB.
- 25 7. Procédé selon la Revendication 5, caractérisé en ce que l'extrait biologique contenant l'agent viral est constitué par une culture du virus de l'hépatite NANB, sur une lignée cellulaire continue d'hépatocytes.
- 30 8. Procédé selon l'une quelconque des Revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que l'extrait biologique est préalablement soumis à une centrifugation à 5000-8000 g, à l'issue de laquelle le surnageant est filtré à travers un filtre de porosité 0,22 µm.
- 35 9. Procédé selon la Revendication 8, caractérisé en ce que préalablement à la filtration et à la centrifugation, l'extrait biologique est soumis à un traitement de dissociation physique, notamment par ultra-sons, ou à un traitement de dissociation chimique.
- 40 10. Procédé de culture d'un agent viral selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4, caractérisé en ce que des hépatocytes, ou des lignées cellulaires continues d'hépatocytes, sont inoculés par un extrait de fèces d'un patient atteint d'hépatite NANB, ou par un extrait de foie d'un singe inoculé par un extrait de fèces de patients souffrant d'hépatite NANB, et cultivés jusqu'à confluence de la culture.
11. Application d'un agent viral selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4, au diagnostic in vitro de l'hépatite NANB épidémique, sporadique, et post transfusionnelle.
- 45 12. Procédé de détection d'anticorps spécifiques de l'hépatite NANB et associés à la fois à l'hépatite épidémique, sporadique, et post transfusionnelle, dans un échantillon de sang ou de produit dérivé du sang, lequel procédé est caractérisé en ce que dans une première étape, l'on met en contact ledit échantillon avec un réactif constitué par un agent viral selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4, et dans une deuxième étape, on met en évidence la formation d'un complexe antigène-anticorps entre ledit agent viral, et des anticorps spécifiques de l'hépatite NANB éventuellement présents dans ledit échantillon.
- 50 13. Réactifs de diagnostic de l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, caractérisés en ce qu'ils comprennent une préparation de l'antigène viral selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4.
- 55 14. Agent thérapeutique pour le traitement de l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement une préparation d'un agent viral

selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4.

15. Réactifs de diagnostic de l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, caractérisés en ce qu'ils comprennent des anticorps dirigés contre une préparation de l'antigène viral selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4.

16. Agent thérapeutique pour le traitement de l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle, caractérisé en ce qu'il comprend des anticorps dirigés contre une préparation de l'antigène viral selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4.

#### Revendications pour les Etats contractants suivants : ES, GR

1. Procédé d'isolement d'un agent viral associé à l'hépatite virale NANB sporadique, épidémique et post-transfusionnelle et susceptible d'être obtenu à partir des fèces de patients atteints d'hépatite NANB, caractérisé en ce que l'on procède à la centrifugation, sur un gradient de CsCl ou sur un gradient de saccharose, d'un extrait biologique contenant ledit agent viral, et en ce qu'on recueille ledit agent dans les fractions du gradient de CsCl dont la densité est comprise entre 1,29 et 1,32 g/cm<sup>3</sup>, ou dans les fractions du gradient de saccharose contenant entre 40 et 41,5 % (p/v) de saccharose, sous forme de particules sphériques de 75 nm de diamètre environ, et/ou dans les fractions du gradient de CsCl dont la densité est comprise entre 1,12 et 1,19 g/cm<sup>3</sup>, ou dans les fractions du gradient de saccharose contenant entre 26 et 28 % (p/v) de saccharose, sous forme de particules sphériques de 25 à 30 nm de diamètre, les deux types de particules étant associés à un même antigène viral :

a) des particules sphériques d'environ 75 nm de diamètre, dont la densité sur un gradient de CsCl est comprise entre 1,28 et 1,32 g/cm<sup>3</sup>, et qui sédimentent dans les fractions d'un gradient de saccharose contenant entre 40 et 41,5 % (p/v) de saccharose,

b) des particules sphériques de 25 à 30 nm de diamètre, dont la densité sur un gradient de CsCl est comprise entre 1,12 et 1,19 g/cm<sup>3</sup>, et qui sédimentent dans les fractions d'un gradient de saccharose contenant entre 26 et 28 % (p/v) de saccharose.

2. Procédé selon la Revendication 1, caractérisé en ce que l'on purifie un agent viral ayant les caractéristiques d'une souche dite "souche Clamart", déposée le 30 Octobre 1986 sous le numéro I-617, auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes.

3. Procédé selon la Revendication 1, caractérisé en ce que l'on purifie un agent viral ayant les caractéristiques d'une souche, dite "souche Ivoirienne", déposée le 30 Octobre 1986 sous le numéro I-616 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes.

4. Procédé selon la Revendication 1, caractérisé en ce que l'on purifie un agent viral ayant les caractéristiques d'une souche, dite "souche H-SET", déposée le 5 Février 1987 sous le numéro 87.02.05.02 auprès de la Collection ECACC (Grande Bretagne).

5. Procédé selon la Revendication 1, caractérisé en ce que l'extrait biologique comprenant l'agent viral est constitué par des fèces de patients atteints d'hépatite NANB.

6. Procédé selon la Revendication 1, caractérisé en ce que l'extrait biologique contenant l'agent viral est constitué par une culture du virus de l'hépatite NANB, sur une lignée cellulaire continue d'hépatocytes.

7. Procédé selon l'une quelconque des Revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que l'extrait biologique est préalablement soumis à une centrifugation à 5000-8000 g, à l'issue de laquelle le surnageant est filtré à travers un filtre de porosité 0,22 µm.

8. Procédé selon la Revendication 7, caractérisé en ce que préalablement à la filtration et à la centrifugation, l'extrait biologique est soumis à un traitement de dissociation physique, notamment par ultra-sons, ou à un traitement de dissociation chimique.

9. Procédé de culture d'un agent viral obtenu par un procédé selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4, caractérisé en ce que des hépatocytes, ou des lignées cellulaires continues d'hépatocytes, sont inoculés par un extrait de fèces d'un patient atteint d'hépatite NANB, ou par un extrait de foie d'un

singe inoculé par un extrait de fèces de patients souffrant d'hépatite NANB, et cultivés jusqu'à confluence de la culture.

- 5 10. Application d'un agent viral obtenu par un procédé selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4, au diagnostic in vitro de l'hépatite NANB épidémique, sporadique, et post transfusionnelle.
- 10 11. Procédé de détection d'anticorps spécifiques de l'hépatite NANB et associés à la fois à l'hépatite épidémique, sporadique, et post transfusionnelle, dans un échantillon de sang ou de produit dérivé du sang, lequel procédé est caractérisé en ce que dans une première étape, l'on met en contact ledit échantillon avec un réactif constitué par un agent viral obtenu par un procédé, selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4, et dans une deuxième étape, on met en évidence la formation d'un complexe antigène-anticorps entre ledit agent viral, et des anticorps spécifiques de l'hépatite NANB éventuellement présents dans ledit échantillon.
- 15 12. Application d'un agent viral obtenu par un procédé selon l'une quelconque des Revendications 1 à 4 pour l'obtention d'un agent thérapeutique pour le traitement de l'hépatite virale NANB épidémique, sporadique ou post-transfusionnelle.

#### Claims

20 **Claims for the following Contracting States : AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE**

- 25 1. Purified viral agent associated with sporadic, epidemic and posttransfusional viral hepatitis NANB, characterised in that it can be obtained from the faeces of patients suffering from hepatitis NANB and in that it is in the form of two main types of spherical viral particles associated with the same viral antigen:
  - a) spherical particles of about 75 nm in diameter whose density in a CsCl gradient is between 1.28 and 1.32 g/cm<sup>3</sup> and which sediment in sucrose gradient fractions containing between 40 and 41.5% (w/v) of sucrose,
  - 30 b) spherical particles from 25 to 30 nm in diameter whose density in a CsCl gradient is between 1.12 and 1.19 g/cm<sup>3</sup> and which sediment in sucrose gradient fractions containing between 26 and 28% (w/v) of sucrose.
- 35 2. Strain of a purified viral agent according to Claim 1, called "Clamart strain", deposited with the Collection Nationale de Cultures de Microorganismes on 30 October 1986 under the number I-617.
3. Strain of a purified viral agent according to Claim 1, called "Ivoirian strain", deposited with the Collection Nationale de Cultures de Microorganismes on 30 October 1986 under the number I-616.
- 40 4. Strain of a purified viral agent according to Claim 1, called "H-SET strain", deposited with the ECACC Collection (Great Britain) on 5 February 1987 under the number 87.02.05.02.
- 45 5. Process for isolating a viral agent according to any one of Claims 1 to 4, characterised in that a biological extract containing the said viral agent is centrifuged in a CsCl gradient or in a sucrose gradient, and in that the said agent is collected in the CsCl gradient fractions whose density is between 1.29 and 1.32 g/cm<sup>3</sup> or in the sucrose gradient fractions containing between 40 and 41.5% (w/v) of sucrose, in the form of spherical particles of about 75 nm in diameter, and/or in the CsCl gradient fractions whose density is between 1.12 and 1.19 g/cm<sup>3</sup>, or in the sucrose gradient fractions containing between 26 and 28% (w/v) of sucrose, in the form of spherical particles from 25 to 30 nm in diameter.
- 50 6. Process according to Claim 5, characterised in that the biological extract containing the viral agent consists of faeces from patients suffering from hepatitis NANB.
7. Process according to Claim 5, characterised in that the biological extract containing the viral agent consists of a culture of hepatitis NANB virus on a continuous liver cell line.
- 55 8. Process according to either of Claims 6 and 7, characterised in that the biological extract is subjected beforehand to centrifugation at 5000-8000 g, at the end of which the supernatant is filtered through a filter with a porosity of 0.22 µm.

9. Process according to Claim 8, characterised in that prior to the filtration and the centrifugation, the biological extract is subjected to a physical dissociation treatment, especially by sonication, or to a chemical dissociation treatment.
- 5 10. Process for culturing a viral agent according to any one of Claims 1 to 4, characterised in that liver cells or continuous liver cell lines are inoculated with a faecal extract from a patient suffering from hepatitis NANB, or with a liver extract from a monkey inoculated with a faecal extract from patients suffering from hepatitis NANB, and cultured until the culture becomes confluent.
- 10 11. Application of a viral agent according to any one of Claims 1 to 4, in the in vitro diagnosis of epidemic, sporadic and posttransfusional hepatitis NANB.
12. Process for the detection of antibodies specific for hepatitis NANB and associated at the same time with epidemic, sporadic and posttransfusional hepatitis, in a blood sample or in a sample of product  
15 derived from blood, which process is characterised in that, in a first stage, the said sample is brought into contact with a reagent consisting of a viral agent according to any one of Claims 1 to 4 and, in a second stage, the formation of an antigen-antibody complex between the said viral agent and antibodies specific for hepatitis NANB, which may be present in the said sample, is detected.
- 20 13. Reagents for the diagnosis of epidemic, sporadic or posttransfusional viral hepatitis NANB, characterised in that they contain a preparation of the viral antigen according to any one of Claims 1 to 4.
14. Therapeutic agent for the treatment of epidemic, sporadic or posttransfusional viral hepatitis NANB, characterised in that it essentially contains a preparation of a viral agent according to any one of Claims  
25 1 to 4.
15. Reagents for the diagnosis of epidemic, sporadic or posttransfusional viral hepatitis NANB, characterised in that they contain antibodies directed against a preparation of the viral antigen according to any one of Claims 1 to 4.
- 30 16. Therapeutic agent for the treatment of epidemic, sporadic or posttransfusional viral hepatitis NANB, characterised in that it contains antibodies directed against a preparation of the viral antigen according to any one of Claims 1 to 4.

35 **Claims for the following Contracting States : ES, GR**

1. Process for isolating of a viral agent associated with sporadic, epidemic and posttransfusional viral hepatitis NANB and capable of being obtained from the faeces of patients suffering from hepatitis NANB, characterised in that a biological extract containing the said viral agent is centrifuged in a CsCl  
40 gradient or in a sucrose gradient, and in that the said agent is collected in the CsCl gradient fractions whose density is between 1.29 and 1.32 g/cm<sup>3</sup> or in the sucrose gradient fractions containing between 40 and 41.5% (w/v) of sucrose, in the form of spherical particles of about 75 nm in diameter, and/or in the CsCl gradient fractions whose density is between 1.12 and 1.19 g/cm<sup>3</sup>, or in the sucrose gradient fractions containing between 26 and 28% (w/v) of sucrose, in the form of spherical particles from 25 to  
45 30 nm in diameter, both types of particles being associated with the same viral antigen:  
a) spherical particles of about 75 nm in diameter whose density in a CsCl gradient is between 1.28 and 1.32 g/cm<sup>3</sup> and which sediment in the sucrose gradient fractions containing between 40 and 41.5% (w/v) of sucrose,  
b) spherical particles from 25 to 30 nm in diameter whose density in a CsCl gradient is between  
50 1.12 and 1.19 g/cm<sup>3</sup> and which sediment in the sucrose gradient fractions containing between 26 and 28% (w/v) of sucrose.
2. Process according to Claim 1, characterised in that a viral agent is purified which has the characteristics of a strain, called "Clamart strain", deposited with the Collection Nationale de Cultures de  
55 Microorganismes on 30 October 1986 under the number I-617.
3. Process according to Claim 1, characterised in that a viral agent is purified which has the characteristics of a strain, called "Ivoirian strain", deposited with the Collection Nationale de Cultures de



Microorganismes on 30 October 1986 under the number I-616.

4. Process according to Claim 1, characterised in that a viral agent is purified which has the characteristics of a strain, called "H-SET strain", deposited with the ECACC Collection (Great Britain) on 5 February 1987 under the number 87.02.05.02.
5. Process according to Claim 1, characterised in that the biological extract containing the viral agent consists of faeces from patients suffering from hepatitis NANB.
6. Process according to Claim 1, characterised in that the biological extract containing the viral agent consists of a culture of hepatitis NANB virus on a continuous liver cell line.
7. Process according to either of Claims 5 and 6, characterised in that the biological extract is subjected beforehand to centrifugation at 5000-8000 g, at the end of which the supernatant is filtered through a filter with a porosity of 0.22  $\mu\text{m}$ .
8. Process according to Claim 7, characterised in that prior to the filtration and the centrifugation, the biological extract is subjected to a physical dissociation treatment, especially by sonication, or to a chemical dissociation treatment.
9. Process for culturing a viral agent obtained by a process according to any one of Claims 1 to 4, characterised in that liver cells or continuous liver cell lines are inoculated with a faecal extract from a patient suffering from hepatitis NANB, or with a liver extract from a monkey inoculated with a faecal extract from patients suffering from hepatitis NANB, and cultured until the culture becomes confluent.
10. Application of a viral agent obtained by a process according to any one of Claims 1 to 4, in the in vitro diagnosis of epidemic, sporadic and posttransfusional hepatitis NANB.
11. Process for the detection of antibodies specific for hepatitis NANB and associated at the same time with epidemic, sporadic and posttransfusional hepatitis, in a blood sample or in a sample of product derived from blood, which process is characterised in that, in a first stage, the said sample is brought into contact with a reagent consisting of a viral agent obtained by a process, according to any one of Claims 1 to 4, and, in a second stage, the formation of an antigen-antibody complex between the said viral agent and antibodies specific for hepatitis NANB, which may be present in the said sample, is detected.
12. Application of a viral agent obtained by a process according to any one of Claims 1 to 4 in the production of a therapeutic agent for the treatment of epidemic, sporadic or posttransfusional viral hepatitis NANB.

#### Patentansprüche

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. Gereinigtes virales Mittel, assoziiert mit der sporadischen, epidemischen und posttransfusionellen viralen Hepatitis NANB, dadurch gekennzeichnet, daß es aus dem Stuhl von Patienten mit Hepatitis NANB erhalten werden kann und daß es in der Form von kugelförmigen viralen Teilchen von zwei Haupttypen, die mit einem gleichen viralen Antigen assoziiert sind, vorliegt:
  - (a) kugelförmige Teilchen mit einem Durchmesser von ungefähr 75 nm, deren Dichte auf einem CsCl-Gradienten zwischen 1,28 und 1,32 g/cm<sup>3</sup> liegt und die in den Fraktionen eines Saccharosegradienten, die zwischen 40 und 41,5 % (Gewicht/Vol.) Saccharose enthalten, sedimentieren,
  - (b) kugelförmige Teilchen mit einem Durchmesser von 25 bis 30 nm, deren Dichte in einem CsCl-Gradienten zwischen 1,12 und 1,19 g/cm<sup>3</sup> liegt und die in den Fraktionen eines Saccharosegradienten, die zwischen 26 und 28 % (Gewicht/Vol.) Saccharose enthalten, sedimentieren.
2. Stamm eines gereinigten viralen Mittels nach Anspruch 1 mit der Bezeichnung "Stamm Clamart", hinterlegt am 30. Oktober 1986 unter der Nummer I-617 bei der Collection Nationale de Cultures de Microorganismes.

3. Stamm eines gereinigten viralen Mittels nach Anspruch 1 mit der Bezeichnung "Stamm Ivoirienne", hinterlegt am 30. Oktober 1986 unter der Nummer I-616 bei der Collection Nationale de Cultures de Microorganismes.
- 5 4. Stamm eines gereinigten viralen Mittels nach Anspruch 1 mit der Bezeichnung "Stamm H-SET", hinterlegt am 5. Februar 1987 unter der Nummer 87.02.05.02 bei der Collection ECACC (Großbritannien).
- 10 5. Verfahren zur Isolierung eines viralen Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch **gekennzeichnet**, daß man in einem CsCl-Gradienten oder einem Saccharosegradienten einen biologischen Extrakt, der das virale Mittel enthält, zentrifugiert, das Mittel in den Fraktionen des CsCl-Gradienten, deren Dichte zwischen 1,29 und 1,32 g/cm<sup>3</sup> beträgt, oder in den Fraktionen des Saccharosegradienten, die zwischen 40 und 41,5 % (Gewicht/Vol.) Saccharose enthalten, in Form kugelförmiger Teilchen mit einem Durchmesser von etwa 75 nm gewinnt und/oder in den Fraktionen des CsCl-Gradienten, deren Dichte zwischen 1,12 und 1,19 g/cm<sup>3</sup> beträgt, oder in den Fraktionen des Saccharosegradienten, die zwischen 26 und 28 % (Gewicht/Vol.) Saccharose enthalten, in Form kugelförmiger Teilchen mit einem Durchmesser von 25 bis 30 nm gewinnt.
- 15 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch **gekennzeichnet**, daß der biologische Extrakt, der das virale Mittel umfaßt, aus dem Stuhl von Patienten mit Hepatitis NANB besteht.
- 20 7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch **gekennzeichnet**, daß der biologische Extrakt, der das virale Mittel enthält, aus einer Kultur des Hepatitis-NANB-Virus auf einer kontinuierlichen Hepatozytenzelllinie besteht.
- 25 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 oder 7, dadurch **gekennzeichnet**, daß der biologische Extrakt zuvor bei 5000 bis 8000 g zentrifugiert wird, wonach der Überstand über ein Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert wird.
- 30 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch **gekennzeichnet**, daß vor der Filtration und der Zentrifugation der biologische Extrakt einer physikalischen Dissoziationsbehandlung, insbesondere durch Ultraschall, oder einer chemischen Dissoziationsbehandlung unterworfen wird.
- 35 10. Verfahren zur Züchtung eines viralen Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch **gekennzeichnet**, daß Hepatozyten oder kontinuierliche Hepatozytenzelllinien mit einem Stuhlextrakt eines Patienten mit Hepatitis NANB oder mit einem Extrakt der Leber eines Affen, der mit einem Stuhlextrakt von Patienten, die an Hepatitis NANB leiden, inokuliert worden war, inokuliert werden und bis zum Zusammenfließen der Kultur gezüchtet werden.
- 40 11. Verwendung eines viralen Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur in-vitro-Diagnose der epidemischen, sporadischen und posttransfusionellen Hepatitis NANB.
- 45 12. Verfahren zur Detektion von spezifischen Hepatitis-NANB-Antikörpern, die gleichzeitig mit der epidemischen, sporadischen und posttransfusionellen Hepatitis in Zusammenhang stehen, in einer Blutprobe oder einem von Blut abgeleiteten Produkt, dadurch **gekennzeichnet**, daß man im ersten Schritt die Probe mit einem Reagenz, das aus einem viralen Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4 besteht, in Kontakt bringt, und in einem zweiten Schritt die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes zwischen dem viralen Mittel und den spezifischen Hepatitis-NANB-Antikörpern, die gegebenenfalls in der Probe vorliegen, nachweist.
- 50 13. Reagenzien zur Diagnose der epidemischen, sporadischen und posttransfusionellen viralen Hepatitis NANB, dadurch **gekennzeichnet**, daß sie ein Präparat eines viralen Antigens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfassen.
- 55 14. Therapeutisches Mittel zur Behandlung der epidemischen, sporadischen oder posttransfusionellen viralen Hepatitis NANB, dadurch **gekennzeichnet**, daß es im wesentlichen ein Präparat eines viralen Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfaßt.

15. Reagenzien zur Diagnose der epidemischen, sporadischen und posttransfusionellen viralen Hepatitis NANB, dadurch **gekennzeichnet**, daß sie Antikörper gegen ein Präparat eines viralen Antigens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfassen.
- 5 16. Therapeutisches Mittel zur Behandlung der epidemischen, sporadischen oder posttransfusionellen viralen Hepatitis NANB, dadurch **gekennzeichnet**, daß es Antikörper gegen ein Präparat des viralen Antigens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfaßt.

**Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : ES, GR**

10

1. Verfahren zur Isolierung eines viralen Mittels im Zusammenhang mit der sporadischen, epidemischen und posttransfusionellen viralen Hepatitis NANB, das aus dem Stuhl von Patienten mit Hepatitis NANB isoliert werden kann, dadurch **gekennzeichnet**, daß man auf einem CsCl-Gradienten oder einem Saccharosegradienten einen biologischen Extrakt, der das virale Mittel enthält; zentrifugiert und daß  
 15 man das Mittel aus den Fraktionen des CsCl-Gradienten, deren Dichte zwischen 1,29 und 1,32 g/cm<sup>3</sup> beträgt, oder aus den Fraktionen des Saccharosegradienten, die 40 bis 41,5 % (Gewicht/Vol.) Saccharose enthalten, in Form von kugelförmigen Teilchen mit einem Durchmesser von etwa 75 nm gewinnt und/oder aus den Fraktionen des CsCl-Gradienten, deren Dichte zwischen 1,12 und 1,19 g/cm<sup>3</sup> beträgt, oder aus den Fraktionen des Saccharosegradienten, die zwischen 26 und 28 % (Gewicht/Vol.)  
 20 Saccharose enthalten, in Form von kugelförmigen Teilchen mit einem Durchmesser von 25 bis 30 nm isoliert, wobei die beiden Teilchentypen mit einem gleichen viralen Antigen in Zusammenhang stehen:  
     (a) kugelförmige Teilchen mit einem Durchmesser von ungefähr 75 nm, deren Dichte auf einem CsCl-Gradienten zwischen 1,28 und 1,32 g/cm<sup>3</sup> liegt und die in den Fraktionen eines Saccharosegradienten, die zwischen 40 und 41,5 % (Gewicht/Vol.) Saccharose enthalten, sedimentieren,  
 25      (b) kugelförmige Teilchen mit einem Durchmesser von 25 bis 30 nm, deren Dichte in einem CsCl-Gradienten zwischen 1,12 und 1,19 g/cm<sup>3</sup> liegt und die in den Fraktionen eines Saccharosegradienten, die zwischen 26 und 28 % (Gewicht/Vol.) Saccharose enthalten, sedimentieren.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß man ein virales Mittel reinigt, das die  
 30 Eigenschaften eines Stammes mit der Bezeichnung "Stamm Clamart", hinterlegt am 30. Oktober 1986 unter der Nummer I-617 bei der Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, besitzt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß man ein virales Mittel reinigt, das die  
 35 Eigenschaften eines Stammes mit der Bezeichnung "Stamm Ivoirienne", hinterlegt am 30. Oktober 1986 unter der Nummer I-616 bei der Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, besitzt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß man ein virales Mittel reinigt, das die  
 40 Eigenschaften eines Stammes mit der Bezeichnung "Stamm H-SET", hinterlegt am 5. Februar 1987 unter der Nummer 87.02.05.02 bei der Collection ECACC (Großbritannien), besitzt.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß der biologische Extrakt, der das virale  
 Mittel enthält, aus dem Stuhl von Patienten mit Hepatitis NANB besteht.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß der biologische Extrakt, der das virale  
 45 Mittel enthält, aus einer Kultur des Hepatitis-NANB-Virus auf einer kontinuierlichen Hepatozytenzelllinie besteht.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 oder 6, dadurch **gekennzeichnet**, daß der biologische Extrakt  
 zuvor bei 5000 bis 8000 g zentrifugiert wird, wonach der Überstand über ein Filter mit einer Porengröße  
 50 von 0,22 µm filtriert wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch **gekennzeichnet**, daß vor der Filtration und der Zentrifugation der  
 biologische Extrakt einer physikalischen Dissoziationsbehandlung, insbesondere durch Ultraschall, oder  
 einer chemischen Dissoziationsbehandlung unterworfen wird.
- 55 9. Verfahren zur Züchtung eines viralen Mittels, erhalten nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch **gekennzeichnet**, daß Hepatozyten oder kontinuierliche Hepatozytenzelllinien mit einem Stuhlextrakt eines Patienten mit Hepatitis NANB oder mit einem Extrakt der Leber eines Affen,

der mit einem Stuhlextrakt von Patienten, die an Hepatitis NANB leiden, inokuliert worden war, inokuliert werden und bis zum Zusammenfließen der Kultur gezüchtet werden.

- 5 10. Verwendung eines nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 erhaltenen viralen Mittels zur in-vitro-Diagnose der epidemischen, sporadischen und posttransfusionellen viralen Hepatitis NANB.
- 10 11. Verfahren zur Detektion von Antikörpern, die für die Hepatitis NANB spezifisch sind und die gleichzeitig mit der epidemischen, sporadischen und posttransfusionellen Hepatitis in Zusammenhang stehen, in einer Blutprobe oder einem von Blut abgeleiteten Produkt, dadurch **gekennzeichnet**, daß man in einem ersten Schritt die Probe mit einem Reagenz, das aus einem viralen Mittel, das nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 erhalten worden ist, in Kontakt bringt, und in einem zweiten Schritt die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes zwischen dem viralen Mittel und den für die Hepatitis NANB spezifischen Antikörpern, die gegebenenfalls in der Probe vorliegen, nachweist.
- 15 12. Verwendung eines viralen Mittels, erhalten nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, zum Erhalt eines therapeutischen Mittels zur Behandlung der epidemischen, sporadischen oder posttransfusionellen viralen Hepatitis NANB.

20

25

30

35

40

45

50

55

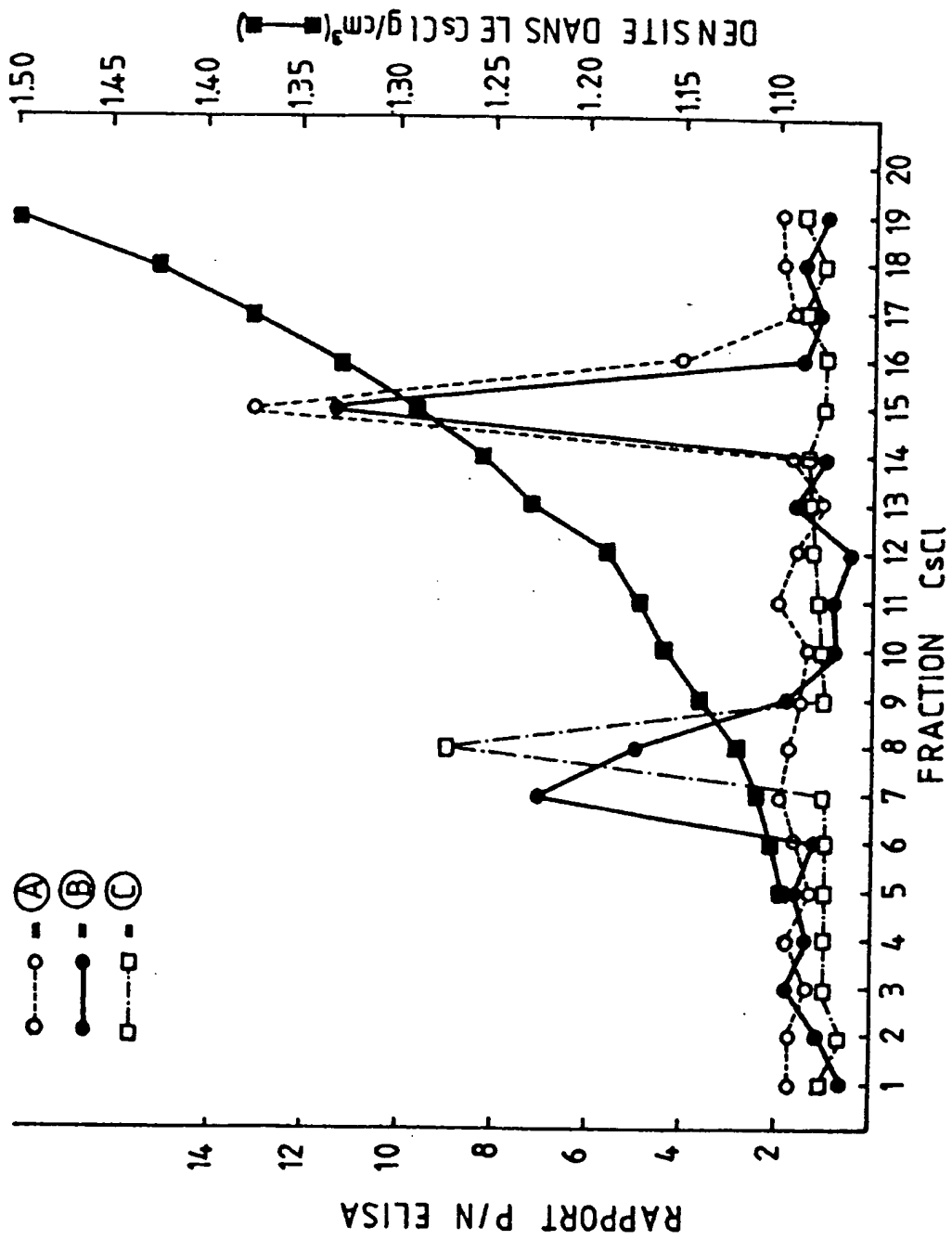


FIG.2

FIG. 3

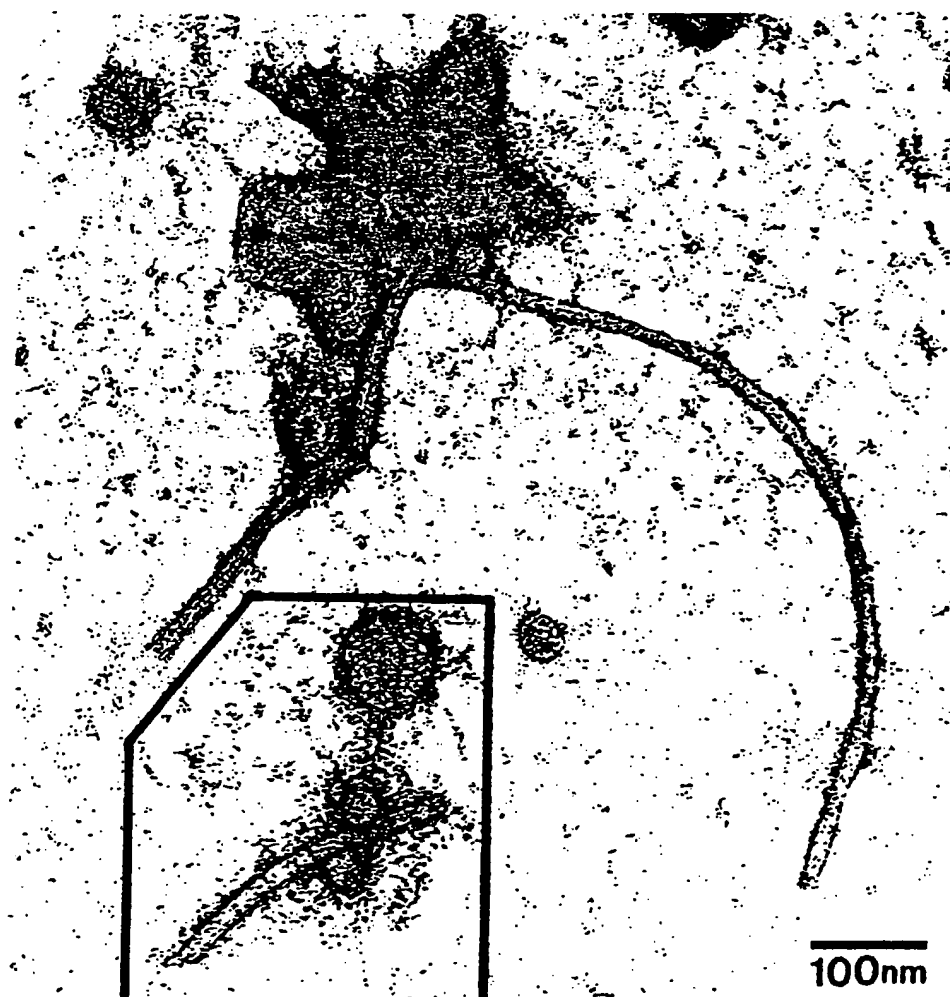


FIG. 4

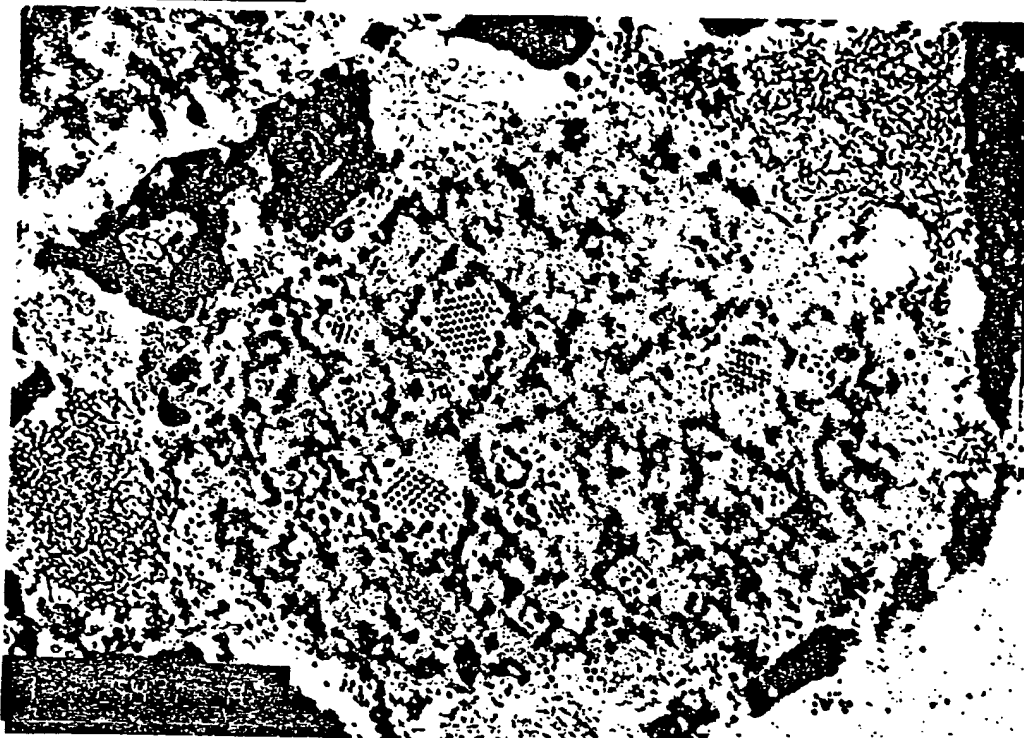


FIG. 5

